UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1961-1962 Série E nº 108

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Jacqueline LESAGE

Pharmacien

Chef de Travaux

PREMIÈRE THÈSE :

ÉTUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL ET DE L'INHIBITION DE CETTE RÉACTION

DEUXIÈME THÈSE :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 1962 **, devant la Commission d'Examen**

Jury { MM. Y. RAOUL, Président
P. MALANGEAU, Professeur
G. DILLEMANN, Professeur

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1961-1962 Série E nº 108

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Jacqueline LESAGE

Pharmacien

Chef de Travaux

PREMIÈRE THÈSE :

ÉTUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL

ET DE

L'INHIBITION DE CETTE RÉACTION

DEUXIÈME THÈSE :

Propositions données par la Faculté

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Soutenues le , devant la Commission d'Examen

Jury { MM. Y. RAOUL, Président
P. MALANGEAU, Professeur
G. DILLEMANN, Professeur

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

-oOo-

ADMINISTRATION

M. G. VALETTE, Doyen

MM. JANOT, Assesseur, L. RODINEAU, Secrétaire Général

M. L. JEANDEL, Secrétaire Général Adjoint

Mme S. CERTAIN, Secrétaire

Mme M.L. ESPINASSE, Secrétaire

M. G. FROISSART, Secrétaire

M. René FABRE, Doyen honoraire, Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. René FABRE, et DELEPINE, Membres de l'Institut
LAUNOY, FLEURY, MASCRE, PICON, BEDEL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538127_0012

PROFESSEURS

MM.	MM. JANOT	Pharmacie galénique (T)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
	M. GUILLOT	Physique (T)
	J. GAUTIER	Chimie organique (T)
Melle	S. LAMBIN	Microbiologie (T)
MM.	Y. RAOUL	Physiologie (T)
	J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
	L. DOMANGE	Chimie minérale (T)
	P. CRETE	Botanique (T)
	R. TRUHAUT	Toxicologie et hygiène industrielle (T)
	A. MORETTE	Hydrologie
	R. CAVIER	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène et éducation sanitaire
	R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.
	A. GERMAN	Virologie et sérologie (T.P.)
	M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
	P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
	G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et histoire de la pharmacie (T)
	G. DEYSSON	Biologie végétale et cryptogamie (T.P.)
	J. FLAHAMT	Minéralogie (T.P.)
	C. BOUDENE	Toxicologie
	A. LE HIR	Pharmacie galénique
	J. RENAULT	Chimie organique

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	Y. COHEN	Sciences naturelles
	P. LARUELLE	Physique
	G. LE MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	C.L. PAOLETTI	Sciences appliquées
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Matière médicale
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	J. POISSON	Sciences naturelles
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J. SAVEL	Sciences naturelles
	J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie
	P. GESTEAU	Physique biologique
	J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section biologie)
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	Microbiologie
MM.	R. LELUC	Microbiologie
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Melle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
MM.	F. PELLERIN	Chimie analytique 2ème et 3ème année
	R. PERLES (F. fonc.)	Chimie biologique
	J. PESTIS (F.F.)	Biologie animale
	P. POULLAIN	Hématologie
	J. RIVET (F.F.)	Physique
Mme	R. ROBERT	Sérologie
Melles	A. ROLLEN	Biologie végétale
	L. SEGUIN (F.F.)	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section physico-chimique)
Mme	M. SEILLER (F.F.)	Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER (F.F.)	Chimie analytique (1ère année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

-oOo-

M.	A. CAVE	Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Melle	H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie
M.	ROBBA	Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Melle	Y. RUYSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
Melle	LAVAUD	Conservateur
Mmes	DESGRIPPES	Bibliothécaire
	KREHMER	Bibliothécaire

A Monsieur Marcel CORMIER

Professeur à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de RENNES.

Dont la bienveillance nous a guidée tout au long de ce travail.

A Monsieur Yves RAOUL

Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS

qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider cette Thèse et qui a été pour nous un guide bienveillant et dévoué.

En hommage de reconnaissance et de respectueux attachement.

A Monsieur DILLEMANN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS.

A Monsieur MALANGEAU

Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS

qui ont bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

J'adresse mes respectueux remerciements.

A mon Père

A mon Mari

A mes Enfants

A tous mes amis

En Témoignage de profonde affection.

ETUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL

ET DE L'INHIBITION DE CETTE REACTION

- oOo -

INTRODUCTION

-oOo-

Avant d'étudier la deshydratation de la vitamine A_1, alcool en présence de lipides extraits de foies, nous allons, en préambule à ce travail, rappeler brièvement l'historique, les propriétés physico-chimiques et les dérivés naturels ou synthétiques de la vitamine A_1.

La vitamine A_1 est un facteur nutritionnel de croissance qui intervient aussi dans certains mécanismes de la vision et qui assure l'intégrité des muqueuses.

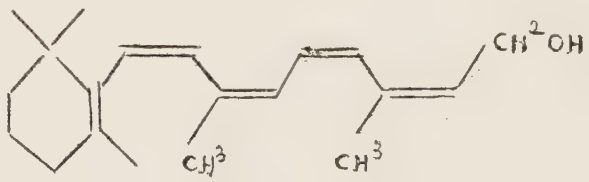
Ces propriétés reposent d'ailleurs sur des fonctions biologiques plus générales de protection exercée par la vitamine A_1 sur les tissus épithéliaux. Elle agit, en outre, sur certaines fonctions glandulaires.

La découverte de l'action physiologique de la vitamine A_1 a précédé de beaucoup son étude théorique, puisque c'est seulement à la suite des travaux de P. KARRER (40) sur l'isolement des provitamines A à partir des végétaux que la vitamine A_1 fut extraite des foies de poissons sous la forme estérifiée. Plus tard, la saponification préalable des foies a permis de l'obtenir à l'état pur. A la suite de ces travaux, P. KARRER (40) proposa la formule $C_{20}H_{30}O$, correspondant, en gros, à une demi molécule de carotène combinée avec une molécule d'eau, ce qui entraine l'apparition d'un groupement hydroxyle terminal.

La structure établie empiriquement par KARRER MORF et SHÖPP (40) fut confirmée par la synthèse de la perhydrovitamine A par KARRER et MORF (41) qui montrèrent son identité avec le produit obtenu par hydrogénation de la vitamine A naturelle.

Des progrès furent faits dans l'étude de la vitamine A_1 par la préparation de dérivés cristallisés par HAMANO (28) en 1935. Deux années plus tard HOLMES et CORBET (33) obtinrent la vitamine A_1 cristallisée à partir d'huiles de foies provenant de différents poissons; puis BAXTER et ROBESON (10) l'isolèrent également sous forme cristallisée par distillation moléculaire de concentrés très riches en vitamine. La première synthèse fut réalisée par KUHN et MORRIS (42) en 1937. Il fallut attendre une dizaine d'années pour qu'elle soit produite industriellement selon le procédé de ARENS et VON DORP (3) ou de ISLER, HUBER, RONCO et KOFLER (34).

La vitamine A alcool (Axérophtol ou Retinol, suivant les décisions de la commission de nomenclature de l'I.U.P.A.C.) cristallise sous forme de prismes jaune pale $C_{20}\ H_{30}\ O$, de formule



Axérophtol ou rétinol (all- trans.)

Selon les travaux de PAULING (65) et de ZECHMEISTER (85) la vitamine est entièrement all - trans.

Propriétés physico-chimiques -

Son poids moléculaire est de 286; l'unité internationale correspond à 0,3 µg de rétinol. Elle est soluble dans les graisses et dans les solvants organiques usuels. Elle est insoluble dans l'eau, mais elle peut être dispersée en émulsion dans une phase aqueuse. Son maximum d'absorption dans l'ultraviolet se situe à 325 mµ avec E 1%/1 cm = 1750 dans le propanol, la courbe d'absorption n'est pas tout à fait symétrique, elle possède une inflexion aux environs de 305 mµ .

Sous l'influence des radiations ultra-violets, elle se détruit très rapidement tout en produisant une fluorescence jaune.

Elle est également très sensible à l'action de l'oxygène et des acides. Par contre, elle résiste très bien aux traitements alcalins.

La structure chimique de la vitamine A_1 laisse prévoir l'existence de nombreux dérivés naturels ou artificiels que nous allons passer maintenant en revue et décrire succintement.

Dans le tableau I nous présentons les principaux dérivés de la vitamine A_1 (les corps rencontrés à l'état naturel sont précédés d'un astérisque).

TABLEAU I

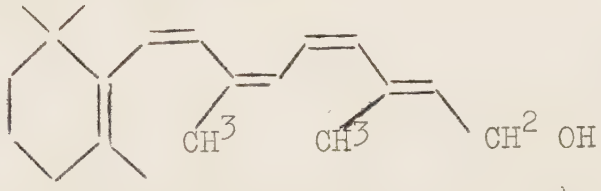
DERIVES NATURELS OU ARTIFICIELS DE LA VITAMINE A_1

V I T A M I N E A_1				
1	2	3	4	5
Isomères naturels	Dérivés oxygènés	Produits d'hydrogénation	produits de condensation	Produits de déshydratation
* Néo-Vitamine A_1	* Aldehyde ou rétinal	Di-hydro-vitamine A_1	* Kitol	Anhydro-vitamine A_1
	Vitamine A_1 acide	Tétra-hydro-Vitamine A_1	*Di-vitamine A_1 Ether	
	Epoxyde de Vitamine A_1	Per Hydro-Vitamine A_1		
	*Subvitamine A_1	Axérophtène		

1°) - Isomère de la Vitamine A naturelle

Néo-vitamine A_1 -

Elle fut isolée en 1945 par ROBESON et BAXTER (73). Elle se trouve associée à la vitamine A_1 dans la plupart des huiles de foies de poissons; son point de fusion plus bas, son coëfficient d'extinction plus faible, et sa moins grande stabilité, lui ont fait attribuer la structure suivante :



son absorption maximum se situe à 328 mμ avec E 1 %/ 1cm = 1.675.

D'après AMES, SWANSON et HARRIS (2) son activité biologique est de 75 % de celle de la trans-vitamine A naturelle.

D'autres isomères de la vitamine A_1 ont été obtenus par synthèse; d'une façon générale les formes trans sont plus actives physiologiquement que les formes cis.

2°) - Ethers de la vitamine A

ISLER (35) synthétisa tout d'abord l'éther méthylique dont l'absorption maximum se situe à 326 mμ avec E 1% / 1 cm. = 1.660. Ce corps a une activité biologique assez voisine de celle de la vitamine A naturelle.

ISLER (36) synthétisa plus tard l'éther butylique puis l'éther phénylique. L'action vitaminique de ces composés est beaucoup plus faible.

3°) - Esters de la vitamine A_1

Plusieurs esters de la vitamine A_1 ont été obtenus cristallisés. Le plus important est l'acétate de vitamine A_1 puisque l'unité internationale est maintenant exprimée soit en rétinol, soit en acétate de rétinol (all-trans) : une unité internationale = 0,344 µg d'acétate de vitamine A_1.

Le maximum d'absorption de l'acétate se situe à 326 mµ avec E 1% / 1 cm. = 1.525 dans l'isopropanol.

ROBESON et BAXTER (72) et ISLER (36) ont étudié l'activité biologique de nombreux esters du rétinol : acétate, succinate, palminate, butyrate, laurate, stéarate, etc...; ces dérivés ont la même activité que celle de la forme alcool.

4°) - Produits d'oxydation

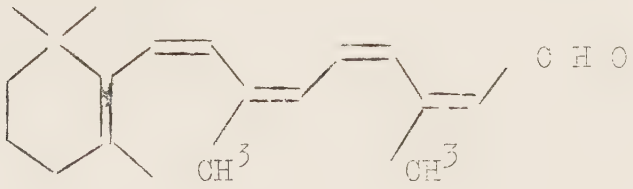
Vitamine A_1 aldéhyde ou rétinal

Dès 1944 MORTON (54) émit l'hypothèse de l'identité de la vitamine A_1 aldéhyde (rétinal) et du rétinène, principal constituant du pourpre rétinien.

Cette hypothèse fut confirmée par les travaux de MORTON et GOODWIN (56) qui préparèrent le rétinal en oxydant le rétinol par le permenganate de potassium et montrèrent son identité avec le rétinène provenant du pourpre rétinien.

Le rétinal peut être très facilement préparé par le procédé de BALL, GOODWIN et MORTON (5) : la vitamine A_1 en solution dans l'éther de pétrole est oxydée par l'oxyde de manganèse pendant 6 à 10 jours à l'obscurité. Dans ces conditions 80 % environ de la vitamine A_1 se transforment en rétinal, ce dernier est isolé par chromatographie et recristallisé dans l'éther de pétrole.

Le rétinal a la structure suivante :



Rétinal.

Seule la fonction alcool primaire de la vitamine A_1 est oxydée. Le maximum de son spectre d'absorption se situe à 375 mμ dans le cyclohexane avec E 1 % / 1 cm = 1.548.

Le rétinal a pratiquement la même activité biologique que l'alcool.

GLOVER, GOODWIN et MORTON (26) ont montré que le rétinal rapidement transformé par le foie en vitamine A_1 est un des intermédiaires de la transformation du carotène en vitamine A_1 par l'organisme.

Vitamine A_1 acide -

Elle n'est pas un dérivé naturel de la vitamine A_1 ; elle peut être préparée par synthèse selon le procédé décrit par VAN DORP et ARENS (83) ou directement à partir du rétinol.

Son spectre d'absorption a un maximum à 347 mμ avec E 1% / 1 cm = 1.460. Elle a la même activité vitaminique que celle de la forme alcool, mais d'après les travaux de ARENS et VAN DORP (3) sur le poulet carencé et ceux de SHARMANN (78) sur le rat, elle n'est pas transformée dans l'organisme en la forme alcool.

Epoxyde de vitamine A -

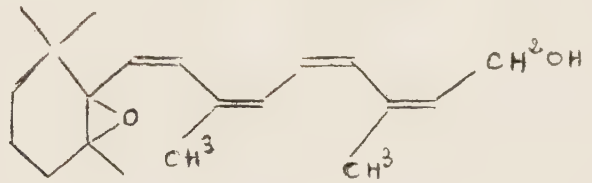
Nous avons vu que le rétinal se forme par action du bioxyde de manganèse sur la vitamine A_1 en solution dans l'éther de pétrole, mais si l'on augmente la proportion de bioxyde de

manganèse la réaction ne s'arrête pas au retinal : il se forme de l'époxyde de vitamine A_1 (LEUNIER) (49 - 50).

A la même époque MILAS et COLL (52) constatèrent, après 8 jours, la présence d'époxyde de vitamine A_1 dans une solution méthanolique de vitamine A_1 naturelle.

La transformation du rétinol en époxyde de vitamine A_1 en solution dans l'éther de pétrole se produit spontanément après quelques jours à l'abri de la lumière (CORMIER) (13).

L'époxyde aurait un atome d'oxygène attaché dans le noyau entre les 2 atomes de carbone voisins de la chaine latérale. Sa structure serait la suivante :



L'époxyde a une absorption maximum à 275 mμ E 1% / 1 cm. = 450. Son activité biologique d'après EULER, KARRER et ZUBRYS (23) est très faible.

Sub. vitamine A_1

Cette substance fut découverte par EMBREE et SHANTZ (21) en chromatographiant des huiles de foies de requins. Elle semble résulter d'une oxydation de la vitamine A_1 naturelle.

Le maximum de son spectre d'absorption fut trouvé à 290 mμ avec E 1% / 1 cm. = 150.

EMBREE et SHANTZ (21) ne lui ont pas reconnu d'activité biologique

5°) - Les dérivés d'hydrogènation

Les dérivés hydrogénés de la vitamine A_1 résultent de la saturation d'une ou plusieurs double-liaisons.

Nous connaissons la dihydrovitamine A_1 préparée par GOULD (27), la tétrahydrovitamine A_1 préparée par RUZICKA et FISHER (74) et la perhydrovitamine A_1 préparée par KARRER et MORF (39).

Cette hydrogènation entraine une perte pratiquement complète de l'activité biologique.

6°) - Produits de condensation

Le Kitol -

EMBREE et SHANTZ (22) l'isolèrent à partir de l'huile de baleine. Son poids moléculaire est environ deux fois celui de la vitamine A_1.

GLOUGH (12) l'a obtenu cristallisé mais sa structure n'est pas connue; son maximum d'absorption se situe à 290 mμ avec E 1% / 1 cm = 707.

Par lui-même il ne possède pas d'activité biologique, sa propriété importante est sa transformation par la chaleur en vitamine A_1.

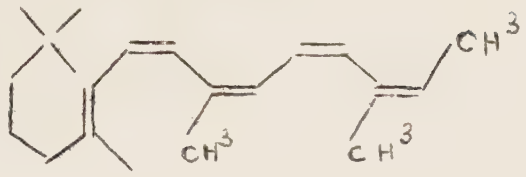
La di-vitamine A_1 éther -

Ce composé fut obtenu par MEUNIER et VINET (51) en traitant la vitamine A_1 alcool par les terres acides. Son spectre présente 2 maxima à 330 et 430 mμ.

7°) - L'axérophtène

L'axérophtène, décrit par KARRER (38) comme étant l'hydrocarbure correspondant à la vitamine A alcool,

a la formule suivante :



Il fut synthétisé par KARRER et BENTZ (36). Quoique son système de double liaisons soit présumé être le même que celui de la vitamine A_1, son spectre d'absorption présente 3 maxima à 331, 346 et 364 mμ avec E 1% /1 cm = 1080, 1260, 952. Son activité biologique d'après VON EULER et KARRER (24) est le 1/5ème de celle de la vitamine A_1; d'après ces auteurs, il se forme in vivo après l'administration d'anhydrovitamine A_1.

8°) - Produits de deshydratation

Anhydrovitamine A_1

Parmi les produits de deshydratation le seul connu est l'anhydrovitamine A_1. Dès 1932 HEILBRON et EDISBURY (18) avaient observé que lorsqu'on traite la vitamine A_1 alcool par les acides minéraux, par exemple par l'acide chlorhydrique gazeux en solution dans l'alcool absolu, le spectre d'absorption de la vitamine A_1 est fortement modifié. Alors que le rétinol présente un maximum d'absorption à 325 mμ le produit de transformation présente des bandes d'absorption à 351, 368, 392 mμ. Il fut alors appelé vitamine A_1 cyclisée par HEILBRON et EDISBURY (30).

En 1943 SHANTZ (77) d'une part et MEUNIER (48) d'autre part, montrèrent que la réaction de préparation ne pouvait conduire à une cyclisation. SHANTZ émit l'hypothèse qu'il s'agissait d'une deshydratation et que le corps obtenu devait être du rétinol deshydraté, qu'il appela anhydrovitamine A_1 sans pour cela proposer de formule développée.

MEUNIER, DULOU, VINET (48) démontrèrent sa structure et les étapes de sa formation.

HEILBRON (29) signale sa présence dans les graisses naturelles, huiles de thon, huiles de morue et d'halibut. Cette anhydrovitamine A_1 possède une activité biologique très faible, environ 0,4 % de celle de la vitamine A_1.

L'existence de nombreux produits de transformation de la vitamine A_1 souligne son manque de stabilité, notamment lorsqu'elle est exposée à l'air et à la lumière. A cette instabilité "in vitro" MOORE (53) et, avec lui, de nombreux auteurs opposent sa très grande stabilité "in vivo" dans le foie, le sang et les autres tissus animaux même au cours de la conservation et de la putréfaction de ces organes.

Ces observations, laissant supposer l'existence dans les tissus animaux de substances capables d'empêcher la destruction de la vitamine A_1, sont le point de départ de notre travail.

Plus particulièrement nous avons adopté le test de résistance à la deshydratation de la vitamine A_1 par des substances synthétiques ou naturelles.

L'anhydrovitamine A_1 se rencontre très rarement et toujours à de très faibles concentrations (moins de 2 % de la vitamine A_1) dans les huiles de foies de poissons. Or la deshydratation de la vitamine est extrêmement facile "in vitro". Afin d'expliquer les raisons de cette stabilité dans les produits naturels provenant des foies, nous avons entrepris l'étude de la deshydratation du rétinol en présence de lipides extraits des foies frais.

PLAN DU TRAVAIL

La première partie sera consacrée à la recherche des conditions physico-chimiques permettant d'etudier la deshydratation de la vitamine A_1 "in vitro" : action de l'éthanol chlorhydrique ou du sulfate de zinc à différents degrés d'hydratation.

Dans la deuxième partie nous aborderons l'analyse de l'action protectrice de lipides extraits de foies d'animaux. Après avoir soigneusement vérifié l'absence d'anhydrovitamine A_1 dans ces huiles et constaté que la vitamine A_1 naturelle présente dans ces lipides ne subit aucune deshydratation dans les conditions précisées au cours de la première partie lors de la formation d'anhydrovitamine à partir de la vitamine A synthétique, nous avons été amenés à rechercher dans ces lipides une substance inhibitrice de la deshydratation du rétinol de synthèse.

Au cours de la troisième partie, nous avons essayé de préciser la nature de cette substance présente dans les lipides extraits des foies qui inhibe ou retarde la deshydratation du rétinol.

A la suite des résultats précédents nous avons utilisé pour inhiber la deshydratation du rétinol des corps synthétiques dérivés de stérols. Nous exposerons les résultats de ces recherches dans la quatrième partie.

Les conclusions générales terminent ce travail.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Rennes sous la direction de Monsieur le Professeur CORMIER qui

nous a proposé le sujet de cette thèse et qui a été pour nous un guide bienveillant et dévoué.

Nous tenons spécialement à remercier Monsieur le Professeur RAOUL qui a dirigé une grande partie de notre travail et qui nous a toujours prodigué ses conseils les plus éclairés et ses encouragements.

Nous remercions également Mademoiselle C. MARNAY qui nous a apporté une aide précieuse et efficace.

Nos remerciements vont également à nos camarades du Laboratoire de Matière Médicale de Rennes; à Mademoiselle J. COLIN pour sa collaboration souriante et dévouée; à Mademoiselle LE BOULCH, du Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, qui nous a conseillée avec dévouement pour la préparation des stéroïdes utilisés dans notre travail.

1ère PARTIE

ETUDE DE LA FORMATION DE L'ANHYDRORETINOL A PARTIR DU RETINOL ET DE L'ACETATE DE RETINOL "IN VITRO"

Le rétinol et l'acétate de rétinol en solution dans l'éthanol peuvent se transformer en anhydrorétinol par action de l'acide chlorhydrique selon un procédé décrit par EDISBURY (18) ; mais il nous a semblé possible d'opèrer cette transformation dans un solvant non polaire tel que l'éther de pétrole en faisant agir du sulfate de zinc à différents degrés d'hydratation.

Nous allons, au cours de la première partie, décrire et étudier comparativement les deux procédés que nous venons de mentionner et les résultats obtenus, après avoir, dans le premier chapitre, résumé les caractères et les propriétés physicochimiques de l'anhydrovitamine A_1 et, dans le deuxième, décrit les procédés de préparation, de caractérisation, de dosage de l'anhydrovitamine A_1 et sa séparation de la vitamine A_1.

1ère PARTIE

CHAPITRE I

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ANHYDROVITAMINE A_1

L'anhydrovitamine A_1 découverte en 1932 par EDISBURY et HEILBRON (18) fut obtenue en traitant la vitamine A_1 alcool par le l'acide chlorhydrique gazeux dissous dans l'éthanol. Elle fut également isolée par EMBREE (19) après distillation moléculaire des huiles de poissons riches en vitamine A_1.

I - STRUCTURE DE L'ANHYDROVITAMINE A_1

EDISBURY et HEILBRON l'avaient considérée comme une vitamine A_1 cyclisée, mais dès 1943, SHANTZ, CAWLEY et EMBREE (77) ont émis l'hypothèse qu'elle pouvait être un hydrocarbure insaturé résultant de la perte d'une molécule d'eau; elle aurait pour formule $C_{20}H_{28}$ plutôt que $C_{20}H_{30}O$.

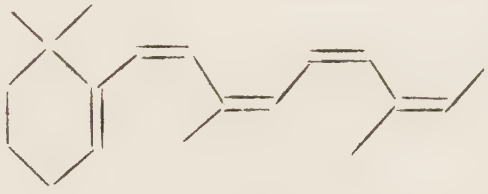
Cette hypothèse reçut une confirmation après les travaux cités par HICKMAN sur la composition centésimale de l'anhydrovitamine A_1 préparée par ROBESON, dont nous donnons ici les résultats analytiques.

ANALYSE DE L'ANHYDROVITAMINE A_1 (d'après HICKMAN) (31)

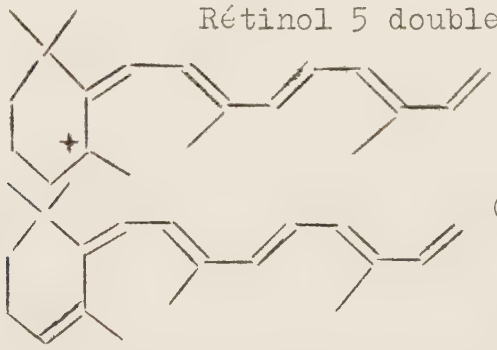
Analyse	C %	H %
Résultats expérimentaux	88,57	10,43
Anhydrovitamine $C_{20}H_{28}$	89,55	10,45
Vitamine A cyclisée $C_{20}H_{30}O$ ..... théorique	83,92	10,49

A la même époque, MEUNIER et DULOU (48) ont suggéré que la formation d'anhydrovitamine A_1 résulte d'une déshydratation. La présence d'acide produit une ionisation de la vitamine A_1 suivie du transfert d'une charge positive à un carbone du cycle ionone. La molécule retrouve sa neutralité électrique par la perte d'un hydrogène de cet atome de carbone et la création d'une double liaison supplémentaire.

L'anhydrovitamine A_1 possède 6 double-liaisons conjuguées au lieu de 5 dans la vitamine A_1. Le mécanisme de sa formation, selon l'explication de MEUNIER, serait le suivant :



Rétinol 5 double-liaisons conjuguées.



Anhydrorétinol - 6 double-liaisons.

Cette dernière formule fut également admise par SHANTZ (76) en 1943.

II - PROPRIETES DE L'ANHYDROVITAMINE A_1

SHANTZ, CAWLEY et EMBREE (77) l'obtinrent après cristallisation dans l'éther de pétrole sous forme de cristaux oranges dont le point de fusion est de 76, 77°.

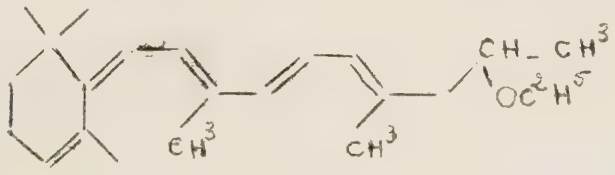
La propriété la plus caractéristique de l'anhydrovitamine A_1 est son spectre d'absorption dans l'ultra-violet qui présente 3 maxima situés à 351, 371 et 392 mμ et dont les valeurs de E 1% / 1 cm. correspondantes sont respectivement : 2500, 3650, 3180. Elle réagit avec le trichlorure d'antimoine (réactif de CARR et PRICE) et les terres acides en donnant une coloration bleue dont la solution présente un maximum à 620 mμ qui est superposable à celle que donne la vitamine A_1 alcool dans les mêmes conditions, mais la valeur d'extinction E 1% /1 cm est de 5.500 alors que celle de la réaction vitamine - $SbCl_3$ est de 4.800.

L'anhydrovitamine A_1 cristallisée se détruit facilement. Abandonnée au contact des solvants organiques, il se produit deux phénomènes :

1°) La formation d'un précipité jaune constitué par un polymère du dérivé anhydre,

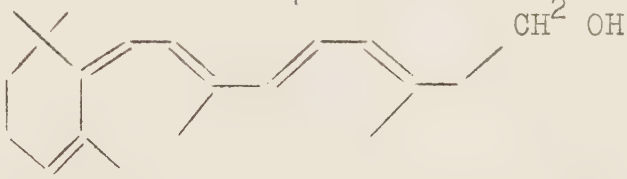
2°) Une modification du spectre d'absorption de la solution, les bandes de l'anhydrovitamine A_1 disparaissent et sont remplacées par trois nouveaux maxima situés à 330, 348, 367 mμ.

SHANTZ (76) a proposé d'appeler isovitamine A_1 ce composé qui semble résulter de la réhydratation de l'anhydrovitamine A_1 ; sa formule n'est pas connue avec certitude, OROSCHNIK (63) en 1954 a suggéré que la transformation de l'anhydrovitamine A_1 en isovitamine A_1, se traduisant par un déplacement des bandes spectrales, s'expliquerait simplement par la perte d'une double liaison de l'anhydrovitamine A_1 et la formation d'un éther éthylique obtenu par solvation du groupe vinyle terminal



D'autre part, selon un récent travail de SHANTZ (76) l'anhydrovitamine A_1 est convertie "in vivo" en un composé ayant vingt fois l'activité biologique de la substance primitive. SHANTZ a proposé d'appeler rehydrovitamine A_1 ce composé extrait de foies de rats carencés en vitamine A_1 et ayant reçu de l'anhydrovitamine A_1. Ce nouveau composé produit une coloration avec le $Sb\ Cl^3$ ayant un maximum à 612 mμ et son spectre d'absorption présente deux minima à 331 et 369 mμ avec inflexion à 351 mμ.

SHANTZ pense que la rehydrovitamine A_1 serait un isomère de la vitamine A_1 de structure suivante :



qui ne diffère de la forme habituelle que par le déplacement des double liaisons.

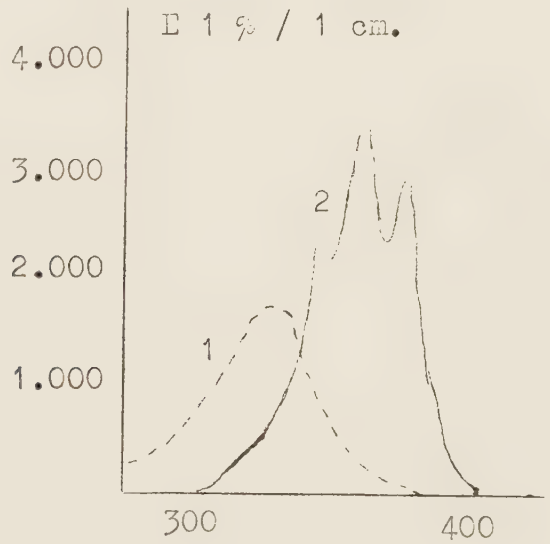


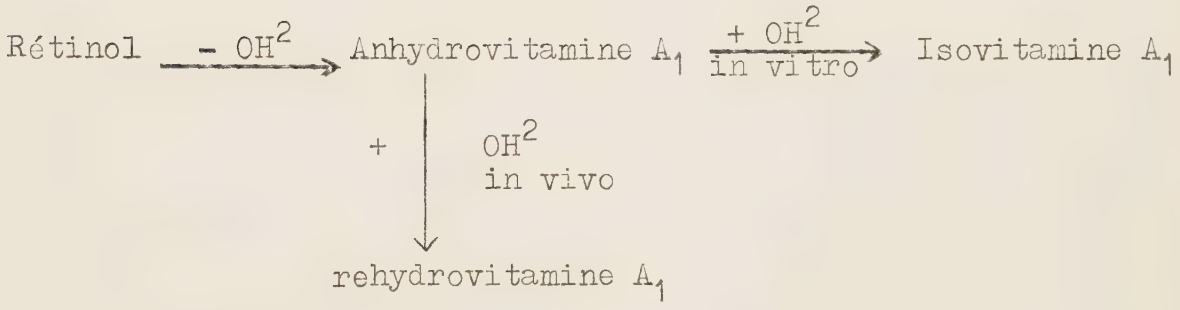
FIGURE I

SPECTRE D'ABSORPTION DE LA VITAMINE A ET DE L'ANHYDROVITAMINE A (d'après SHANTZ et COLL) (77)

1 : Spectre de la vitamine A 2 : Spectre de l'anhydrovitamine A.

Le tableau II schématise les principales transformations de la vitamine A_1 par déshydratation :

TABLEAU II



La figure (1) montre les spectres d'absorption dans l'ultra-violet des corps qui seront étudiés dans la suite du travail : rétinol, anhydrovitamine A_1.

Il faut signaler, dès maintenant, les écarts très importants entre les absorptions spécifiques de ces deux composés et l'absorption intense dans l'ultra-violet de l'anhydrovitamine A_1 dont les valeurs de E 1 % / 1 cm. sont respectivement de : 2.500, 3.650, 3.180 à 251, 371, 392 mμ alors que E 1% / 1 cm. de la vitamine A_1 n'est que 1.750 à 325 mμ.

1ère PARTIE

==========

CHAPITRE 2

PREPARATION ET CARACTERISATION DE L'ANHYDROVITAMINE A: TECHNIQUES

Dans ce chapitre nous avons groupé les techniques utilisées pour préparer l'anhydrovitamine A_1 à partir de la vitamine A_1 : action de l'éthanol chlorhydrique, selon le procédé décrit par EDISBURY (18), action du sulfate de zinc à différents degrés d'hydratation, selon une méthode personnelle.

Nous exposons ensuite les méthodes de dosage et de séparation de la vitamine A_1 de l'anhydrovitamine A_1.

I - REACTIFS UTILISES

1°) - Vitamine A_1 alcool ou rétinol ou axérophtol cristallisée, forme all. trans. provenant des Etablissements HOFFMANN-LAROCHE.
Formule : $C_{20} H_{30} O$
Poids moléculaire : 286,46
Apparence : cristaux jaunâtres
Point de fusion : 59.62° C.
Absorption U V-maximum d'absorption entre 323 et 326mμ (isopropanol).

2°) - Acétate de vitamine A_1 de même origine
Formule : $C_{22} H_{32} O_2$
Poids moléculaire : 328,50
Apparence : cristaux jaunâtres
Point de fusion : 57.60° C.
Absorption U V - maximum d'absorption entre 326,5 et 328,5 mμ (cyclohexane).

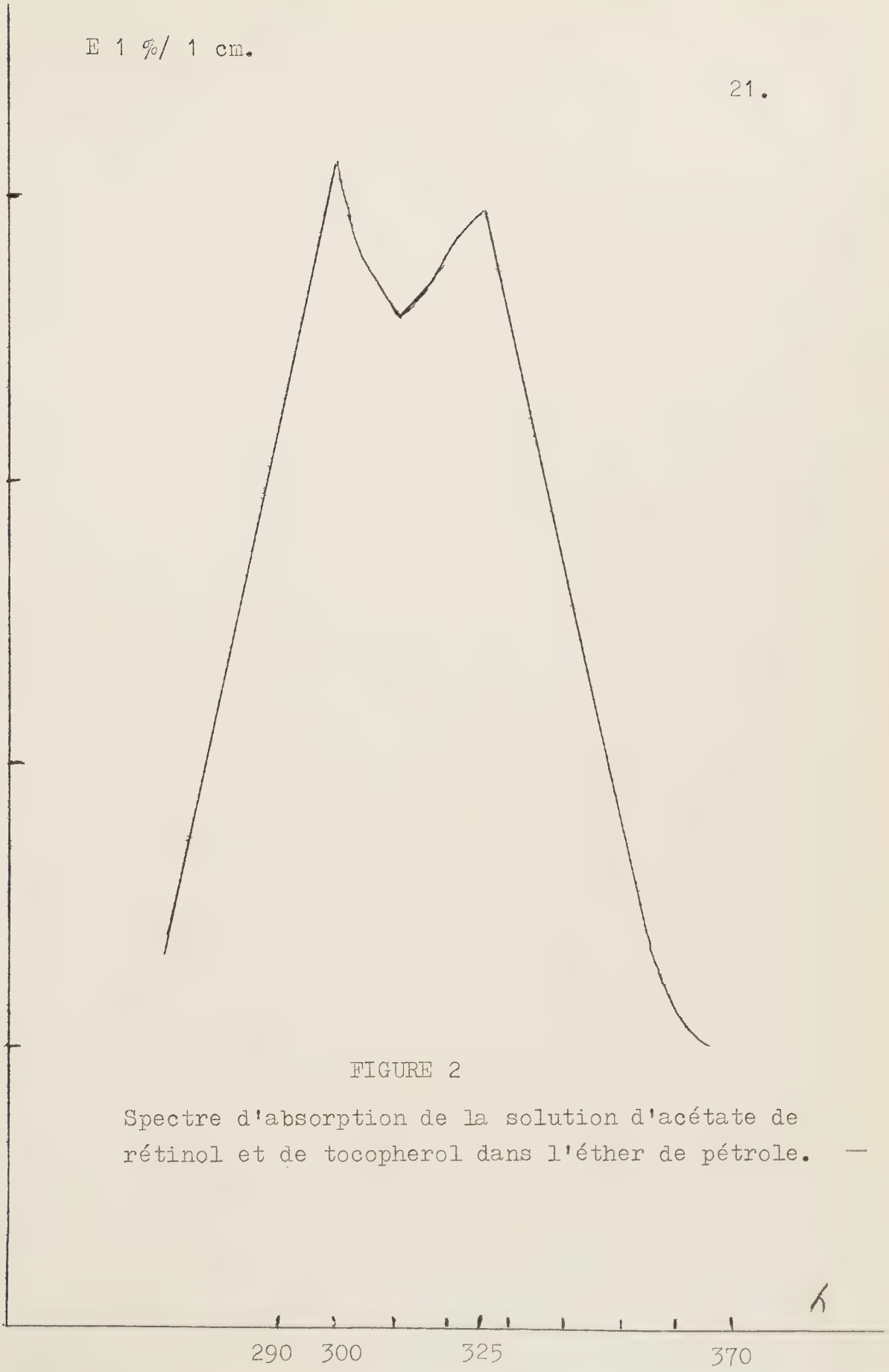


FIGURE 2

Spectre d'absorption de la solution d'acétate de rétinol et de tocopherol dans l'éther de pétrole.

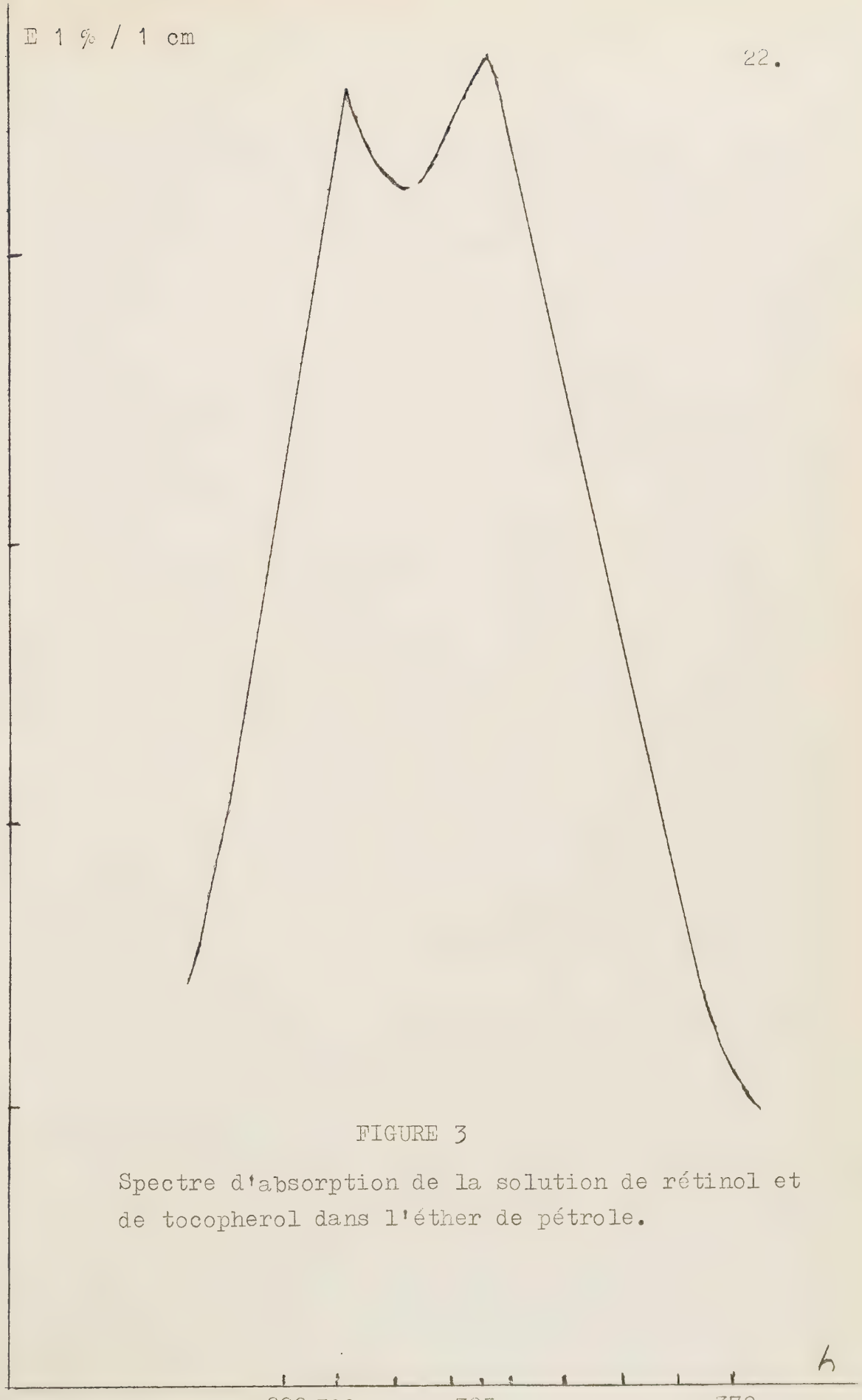


FIGURE 3

Spectre d'absorption de la solution de rétinol et de tocopherol dans l'éther de pétrole.

3°) - Ether de pétrole - Origine : PHILLIPS AMERICAN OIL'S CHEMIST SOCIETY (qualité spectrophotométrie) purifié par lavage à $SO^4 H^2$, neutralisé par le bicarbonate de sodium, lavé à l'eau distillée, desséché par sulfate de sodium anhydre et redistillé en recueillant la fraction passant entre 34° et 36°.

4°) - Solution de rétinol ou d'acétate de rétinol dans l'éther de pétrole renfermant du tocophérol afin d'éviter la transformation spontanée du rétinol en époxyde : CORMIER (13)

rétinol ou acétate de rétinol	10 mg
(d + 1) tocophérol	100 mg
éther de pétrole	100 ml

1 ml de cette solution correspond à 100 µg de rétinol.

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet présente deux maxima situés respectivement à 300 et 325 mµ ; le maximum d'absorption à 300 mµ est dû au tocophérol dont la bande spécifique se trouve déplacée par suite de la présence de rétinol dans la solution. Les figures 2 et 3 montrent le spectre des solutions de rétinol ou d'acétate de rétinol lu au spectrophotomètre de BECKMAN, modèle D.U. sous 1 cm.

Conservée à l'abri de la lumière, cette solution reste stable pendant plusieurs mois.

5°) - Ethanol chlorhydrique obtenu en dissolvant de l'acide chlorhydrique gazeux dans l'éthanol et en diluant cette solution après titrage pour obtenir des concentrations en acide déterminées.

6°) - Sulfate de zinc 7 OH^2 pur, pour analyse RP

II - PREPARATION DE L'ANHYDROVITAMINE A

La méthode classique décrite par les auteurs consiste à transformer la vitamine A_1 en anhydrovitamine A en milieu polaire : éthanol, par action de l'acide chlorhydrique; cette technique, que nous allons rappeler et décrire, ne permet ni d'isoler l'anhydrovitamine A pure par chromatographie, ni de la séparer de la vitamine A_1.

Pour obtenir la déshydratation de la vitamine A_1 en milieu non polaire : éther de pétrole, nous avons utilisé des sels possèdant des propriétés déshydratantes : sulfate de sodium anhydre, sulfate de cadmium, sulfate de magnésium anhydre, sulfate de zinc, parmi ceux-ci seul le sulfate de zinc permet de transformer facilement la vitamine A_1 en anhydrovitamine A. L'avantage de cette technique est d'opèrer en milieu non polaire; il est alors facile d'isoler l'anhydrovitamine A pure par chromatographie et de doser séparément la vitamine A_1 et l'anhydrovitamine A.

1°) - PREPARATION DE L'ANHYDROVITAMINE A PAR ACTION DE L'ETHANOL CHLORHYDRIQUE ET CARACTERISATION IMMEDIATE PAR EXAMEN SPECTROPHOTOMETRIQUE

La dissolution du retinol dans une solution fortement acide entraine presque immédiatement une modification du spectre dans l'ultra-violet et l'apparition des 3 bandes caractéristiques de l'anhydrovitamine A.

Protocole expérimental -

A/- Préparation de l'anhydrorétinol en milieu polaire

La solution de retinol dans l'éther de pétrole est évaporée sous vide à une température inférieure à 50°; le résidu obtenu est dissous dans une solution d'éthanol acide et transvasé immédiatement dans la cuve de 1 cm. du spectrophotomètre; la lecture est faite contre une solution

d'éthanol acide ne renfermant ni rétinol, ni tocophérol. La formation d'anhydrorétinol est suivie par les modifications du spectre d'absorption en fonction du temps.

B/- Caractérisation de l'anhydrorétinol

L'anhydrorétinol formé est caractérisé par son spectre d'absorption dans l'ultra-violet; les trois maxima d'absorption obtenus se situent respectivement à 350, 368 et 390 mμ.

L'anhydrorétinol préparé par cette technique ne peut être isolé pur, par chromatographie, en raison de la polarité du milieu où il se forme; nous le caractérisons par les modifications du spectre d'absorption de la solution alcoolique. Pour le calcul, nous n'utilisons que le maximum à 390 mμ afin d'éviter les interférences entre la vitamine A_1 et l'isovitamine A_1 qui n'absorbent pas à cette longueur d'onde.

C/- Exemple de calcul

Soit une densité optique lue de 0,250 à 390 mμ, sachant que E 1% / 1 cm. = 3.180 à cette longueur d'onde, la concentration en anhydrorétinol formé sera de 80 μg pour 100 ml.

2°) - METHODE PERSONNELLE
PREPARATION DE L'ANHYDRORETINOL PAR ACTION DU SULFATE DE ZINC EN MILIEU NON POLAIRE

Le rétinol en solution dans l'éther de pétrole mis en contact avec des cristaux de sulfate de zinc à différents degrés d'hydratation, se transforme plus ou moins rapidement en anhydrorétinol. La vitesse de formation de l'anhydrovitamine A dépend directement de la concentration en sulfate de zinc et de la teneur en eau de ce dernier.

Protocole expérimental -

La formation de l'anhydrorétinol par action du sulfate de zinc ne se produit qu'en milieu non polaire; nous avons opéré, en général, dans l'éther de pétrole mais nous avons vérifié que cette transformation s'effectuait également dans le cyclohexane. Par contre, dans l'éthanol ou le méthanol il ne se forme pas d'anhydrovitamine A. Nous utilisons soit le sulfate de zinc 7 OH_2 (RP) pulvérisé grossièrement, soit le sulfate de zinc très deshydraté par un séjour d'environ 6 h. à l'étuve à 100°. Le sulfate de zinc mis en contact avec la solution de rétinol et de tocophérol ne change pas d'aspect, apparemment, au cours de l'experience.

L'anhydrorétinol formé par l'action du sulfate de zinc sur le rétinol en milieu non polaire, est séparé du rétinol après chromatographie et caractérisé par son spectre d'absorption dans l'ultraviolet.

III- METHODE PERSONNELLE
SEPARATION ET DOSAGE DE L'ANHYDRORETINOL

La vitamine A est séparée de l'anhydrovitamine A par chromatographie sur alumine. Nous allons décrire la méthode utilisée qui permet le dosage et la séparation de la vitamine A de l'anhydrovitamine A.

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

A/- Isolement de la vitamine A après chromatographie

La technique que nous avons utilisée se rapproche beaucoup de celle décrite par SERVIGNE (75). Trois conditions sont à respecter :

- choix du solvant
- choix de l'alumine
- et rapport déterminé entre l'absorbant et la substance.

1/- Alumine

Le choix de l'alumine a posé un problème délicat à de nombreux chercheurs, le rétinol se trouvant détruit par une alumine trop active et transformé en anhydrorétinol.

Signalons la technique de MULLER (60-61) qui préconise l'emploi d'alumine de trois activités différentes, celle de LEDERER (44) enfin celle de THOMPSON (81) décrite par LEDERER (44) sur alumine activée par chauffage. En ce qui nous concerne, l'alumine MERK standardisee selon BROCKMANN et SHODDER (11) nous a, comme nous allons le montrer, donné toute satisfaction.

2/- Eluants

Nous avons utilisé successivement l'éther de pétrole, l'éther de pétrole contenant 1 °/$_{oo}$ de méthanol et l'éther de pétrole contenant 1 % de méthanol.

3/- Rapport adsorbant / substance

La quantité d'alumine entrant en jeu dans l'expérience est très importante. Pour procéder à la chromatographie d'environ 10 à 40 μg de rétinol, il est nécessaire d'utiliser 2 g. d'alumine disposée dans une colonne de 8 mm de diamètre et de 40 mm de hauteur. Dans ces conditions, il n'y a ni altération ni destruction du rétinol comme nous allons le montrer.

Chromatographie d'une solution de rétinol dans l'éther de pétrole sur alumine

Nous avons utilisé la solution décrite précédemment et diluée de telle façon que 1 ml = 8 μg de rétinol, dont la densité optique à 325 $m\mu$ est voisine de 1.400. Nous avons fait passer 5 ml. de cette solution sur une colonne contenant 2 grammes d'alumine en prenant soin de finir le chromatogramme en un laps de temps aussi court que possible sans utiliser le vide pour accelérer le passage de l'éluant.

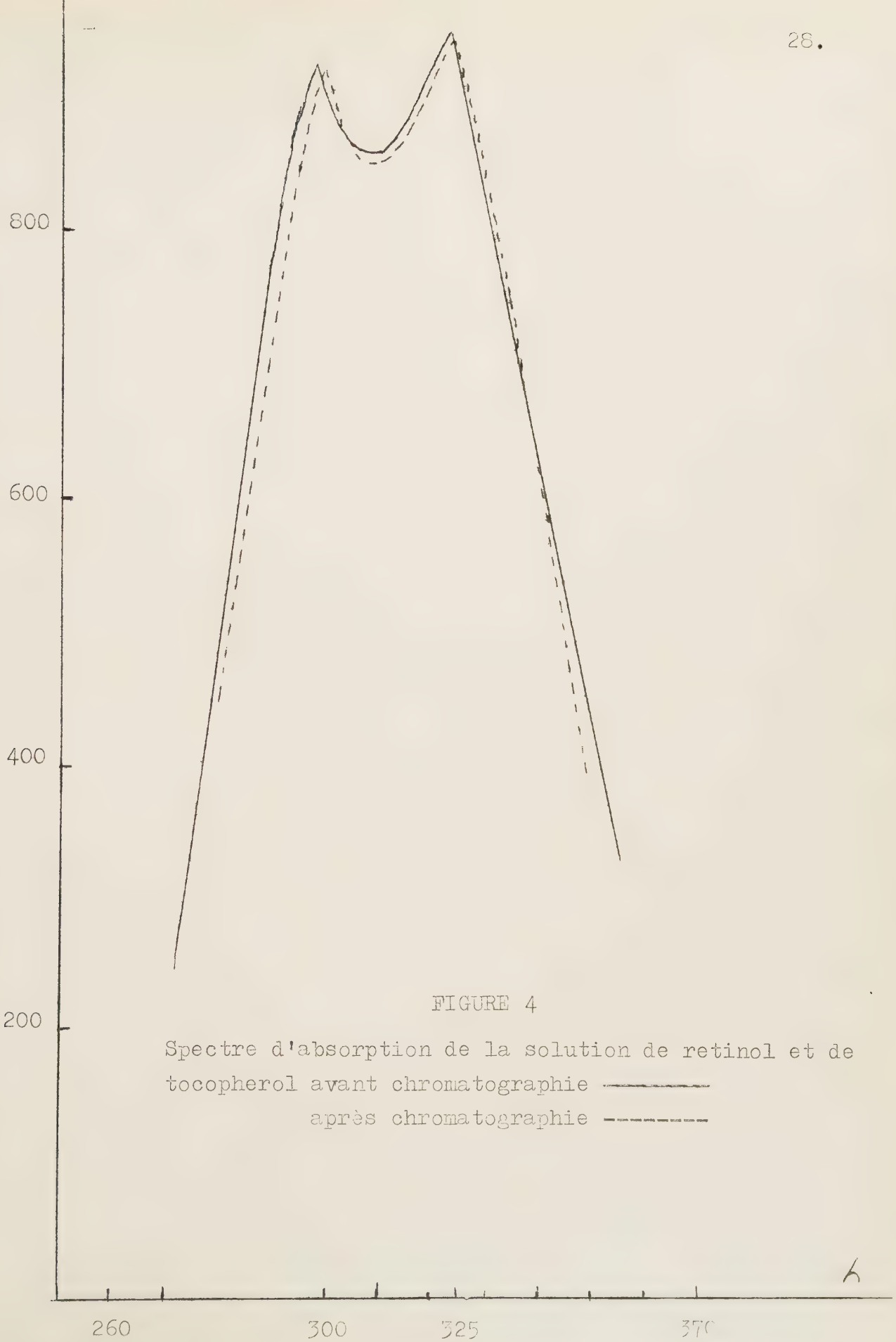


FIGURE 4

Spectre d'absorption de la solution de retinol et de tocopherol avant chromatographie ————
après chromatographie - - - - - -

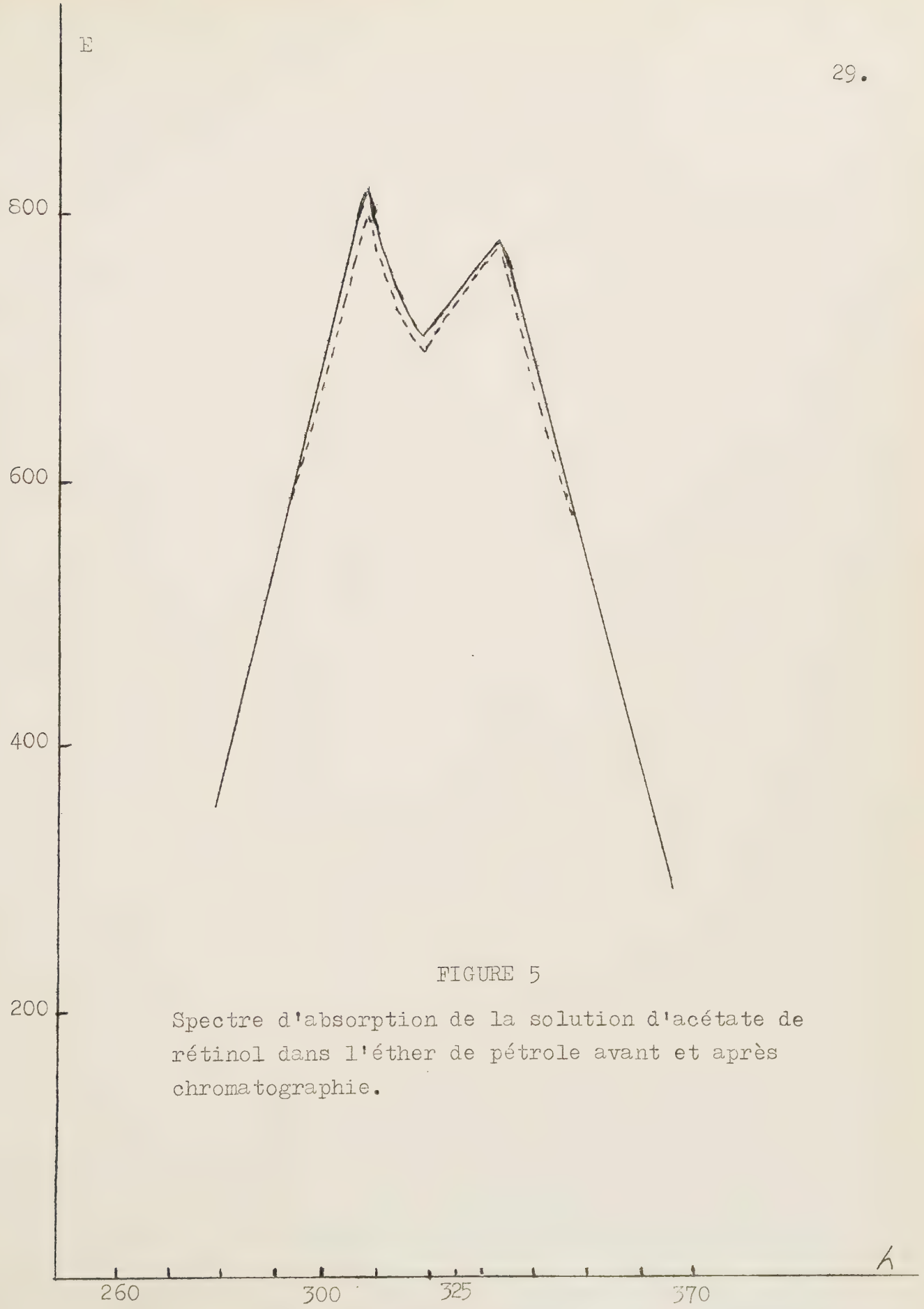


FIGURE 5

Spectre d'absorption de la solution d'acétate de rétinol dans l'éther de pétrole avant et après chromatographie.

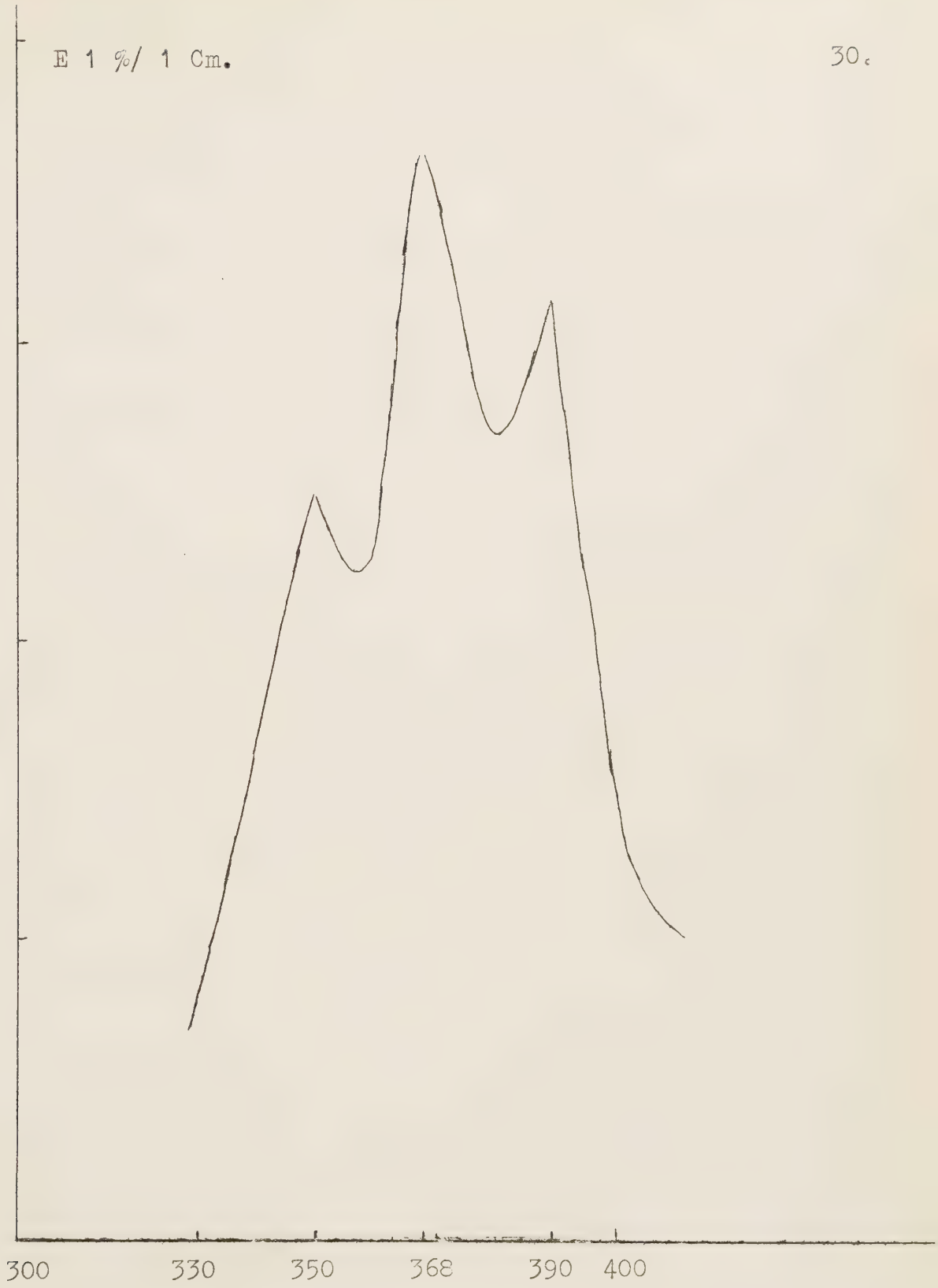


FIGURE 6

Spectre ultra-violet de l'anhydrovitamine A

Le rétinol est fortement fixé sur l'alumine; il ne peut être élué à une vitesse appréciable que par l'éther de pétrole renfermant 1°/$_{oo}$ de méthanol.

La figure (4) donne le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la solution de rétinol et de tocophérol avant et après chromatographie.

Les deux spectres d'absorption avant et après chromatographie superposables démontrent l'absence d'altération et de destruction du rétinol sur alumine dans les conditions expérimentales décrites.

Chromatographie d'une solution d'acétate de rétinol dans l'éther de pétrole sur alumine

Nous avons préparé une solution d'acétate de rétinol et opéré dans les mêmes conditions que précédemment.

L'acétate de rétinol est moins formement fixé sur alumine que le rétinol. Il est élué par l'éther de pétrole renfermant 1°/$_{oo}$ de méthanol. Le spectre d'absorption avant et après chromatographie de la solution d'acétate de rétinol montre, également, sa stabilité sur alumine (figure 5)

B/- Séparation de l'anhydrorétinol

L'anhydrovitamine A est très facilement isolée par chromatographie en raison de son faible pouvoir de fixation sur l'alumine; elle est éluée par l'éther de pétrole et passe dans les premières fractions où elle peut facilement être mise en évidence par son spectre d'absorption caractéristique et ses trois maxima que nous trouvons respectivement situés à 350, 368 et 390 mμ.

La figure (6) donne la courbe de l'anhydrorétinol pur formé par action du sulfate de zinc sur le rétinol en solution dans l'éther de pétrole et isolé par chromatographie sur alumine.

C/- Dosage de la vitamine A et l'anhydrovitamine A après séparation par chromatographie sur alumine

La concentration des composés isolés après chromatographie est obtenue par la détermination de l'absorption maximum pour la radiation λ = 325 mμ pour le rétinol et l'acétate de rétinol et λ = 390 mμ pour l'anhydrorétinol, la valeur théorique de E étant E 1%/1cm = 1750 pour le rétinol E 1%/1cm = 1525 pour l'acétate de rétinol, E 1%/1 cm = 3180 pour l'anhydrorétinol.

IV - CONCLUSION

La déshydratation du rétinol ou de l'acétate de rétinol "in vitro" est obtenue en utilisant, soit l'éthanol chlorhydrique (dans ce cas la caractérisation de l'anhydrorétinol est immédiate par la lecture au spectrophotomètre de la densité optique à 390 mμ, soit le sulfate de zinc en milieu éther de pétrole, la caractérisation et le dosage de l'anhydrovitamine A se faisant après chromatographie sur alumine également par la détermination du spectre d'absorption. Cette méthode permet de séparer soit le rétinol, soit l'acétate de rétinol de l'anhydrovitamine A, sans altération

1ère PARTIE

CHAPITRE 3

ETUDE DE LA FORMATION DE L'ANHYDRORETINOL A PARTIR DU RETINOL OU DE L'ACETATE DE RETINOL "IN VITRO" PAR ACTION DE L'ETHANOL CHLORHYDRIQUE

Pour préciser le mécanisme de la déshydratation de la vitamine A_1 et tenter de réaliser l'étude cinétique et chimique de la réaction, nous avons comparé la transformation en anhydrovitamine A de l'alcool et de l'acétate dans un solvant polaire selon la technique décrite au chapitre précédent, mais, pour ralentir au maximum la vitesse de la réaction, nous avons utilisé des concentrations très faibles en acide chlorhydrique.

I - DESHYDRATATION DU RETINOL EN MILIEU POLAIRE PAR ACTION DE L'ETHANOL CHLORHYDRIQUE

La transformation du rétinol en anhydrorétinol résulte de l'élimination d'une molécule d'eau; il semble, à priori, que ce soit une réaction dépendant seulement de la concentration du composé initial. Nous avons étudié la formation d'anhydrorétinol à partir de deux solutions de rétinol renfermant 100 µg/ml. l'une et 5 µg/ml l'autre.

a) Déshydratation d'une solution renfermant 100 µg/ml de rétinol par l'éthanol chlorhydrique à différentes concentrations

Nous avons utilisé des solutions éthanoliques de faibles concentrations en acide chlorhydrique en présence d'un excès de rétinol. Dans ces conditions, la formation de l'anhydrorétinol peut être suivie en fonction du temps par la modification de la densité optique à 390 mµ.

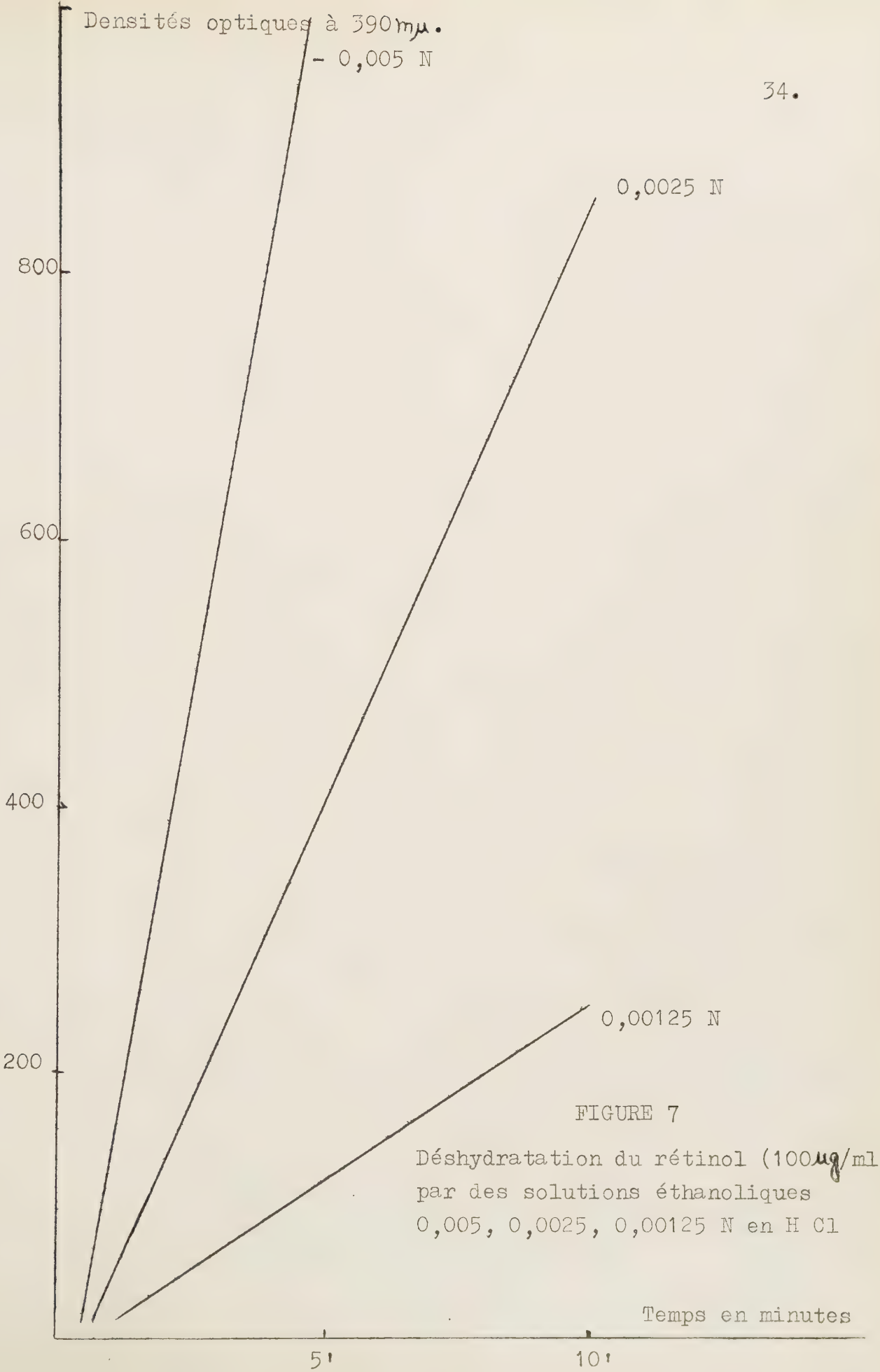


FIGURE 7

Déshydratation du rétinol (100 μg/ml) par des solutions éthanoliques 0,005, 0,0025, 0,00125 N en H Cl

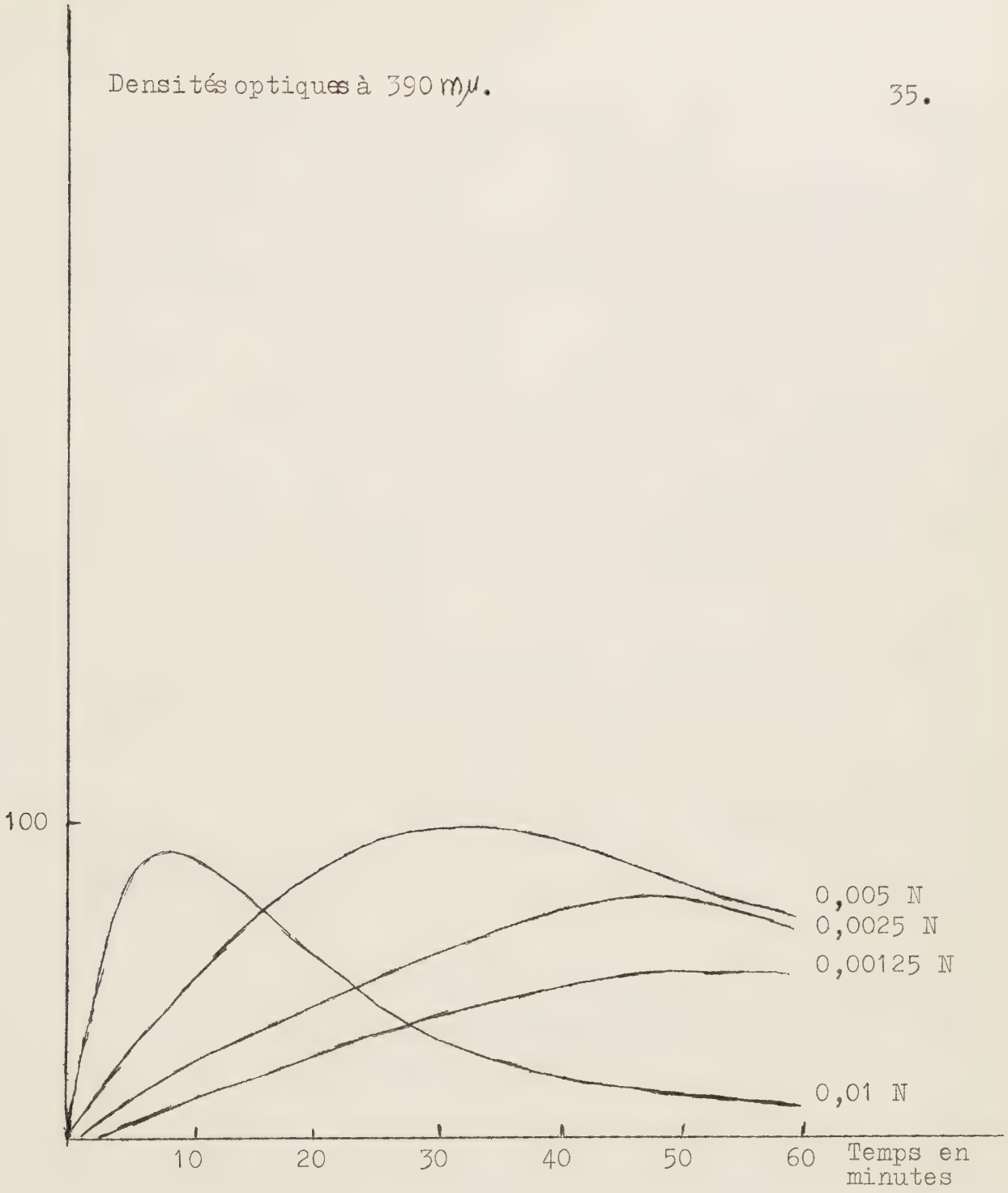


FIGURE 8

Déshydratation du rétinol (5 μg/ml) par des solutions éthanoliques 0,01, 0,005, 0,0025, 0,00125 N en H Cl.

Les courbes de la figure (7) représentent les modifications de la densité optique à 390 mμ d'une solution renfermant 100 μg/ml de rétinol en fonction de la concentration en H Cl et du temps exprimé en minutes, les solutions éthanoliques ayant une concentration 0,005 N, 0,0025 N, 0,00125 N en H Cl.

Résultats -

L'éthanol 0,005 N en H Cl transforme rapidement le rétinol en anhydrorétinol. L'évolution de la densité optique à 390 mμ lisible pendant cinq minutes se présente sous forme d'une droite ne passant pas par l'origine. La vitesse de réaction peut être ralentie en utilisant des solutions 0,0025 N et 0,00125 N en H Cl.

En présence d'un excès de rétinol, la formation d'anhydrovitamine A semble dépendre d'un seul facteur : la concentration en H Cl du milieu.

Il nous a paru intéressant de rechercher si ces résultats obtenus avec une concentration élevée de rétinol se reproduisaient en utilisant, par exemple, des concentrations vingt fois plus faibles.

b) Déshydratation d'une solution renfermant 5 μg/ml de rétinol par l'éthanol chlorhydrique à différentes concentrations

Nous avons utilisé des solutions faibles de rétinol renfermant 5 μg/ml en présence de solutions éthanoliques acides identiques ou plus fortes que celles utilisées dans les expériences précédentes, à savoir : 0,01 N, 0,005, 0,0025 N, 0,00125 N en H Cl, la quantité d'anhydrorétinol formée étant beaucoup plus faible, les lectures ont été prolongées pendant 60 minutes. Les résultats sont représentés sur la figure (8).

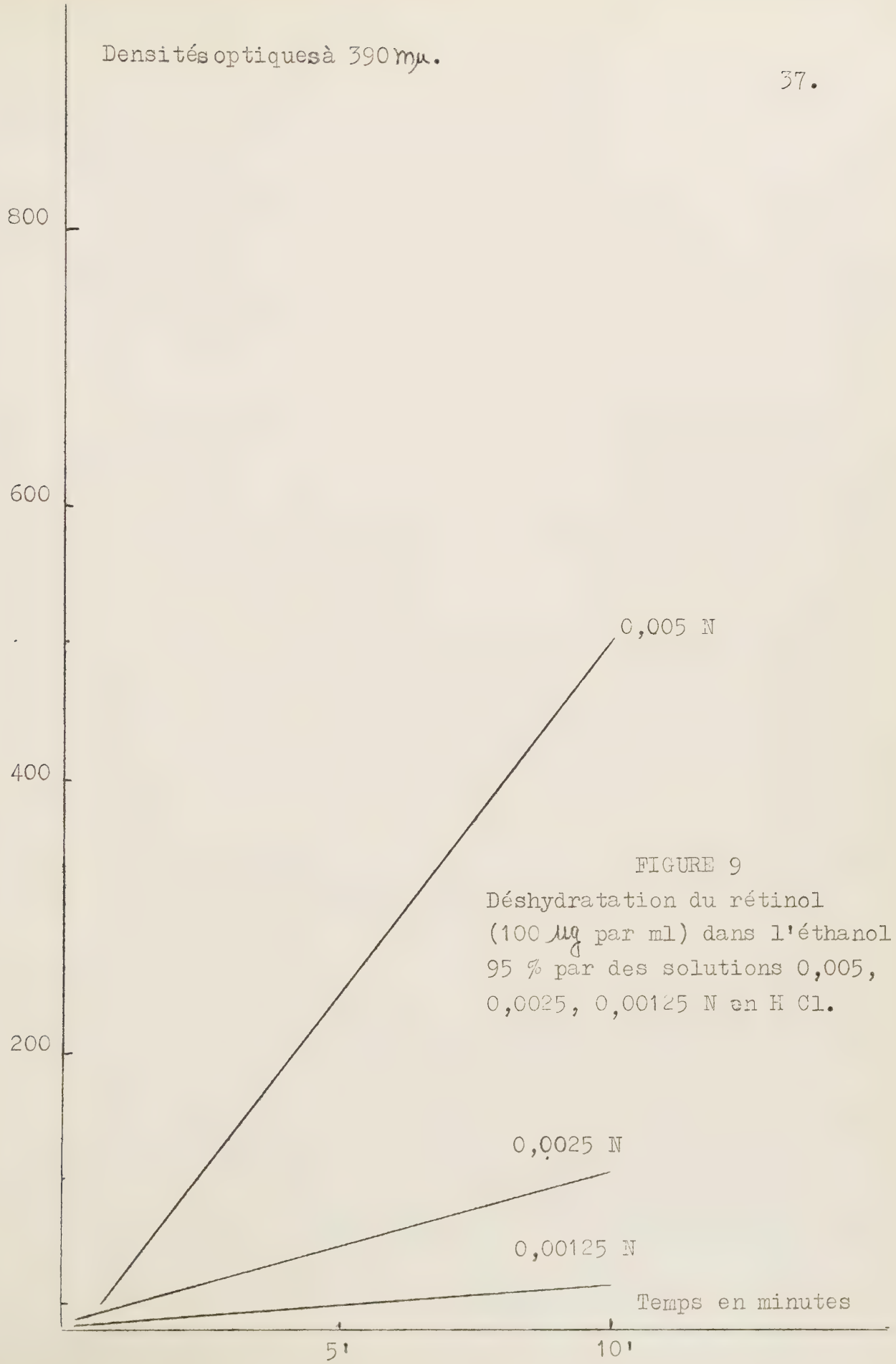


FIGURE 9
Déshydratation du rétinol (100 μg par ml) dans l'éthanol 95 % par des solutions 0,005, 0,0025, 0,00125 N en H Cl.

Résultats -

En présence d'une solution éthanolique 0,01 N en H Cl, la formation d'anhydrovitamine A se déroule en trois phases. Pendant les cinq premières minutes, la densité optique à 390 mμ croit régulièrement puis reste stationnaire pendant les cinq minutes suivantes pour décroitre ensuite.

Le même phénomène se produit avec des solutions acides 0,005 N, la concentration en anhydrorétinol s'élève pendant 20 minutes, reste stationnaire 15 minutes, puis diminue. Avec une solution acide 0,0025 N on ne constate que les deux premières phases du phénomène et avec des solutions 0,00125 N la densité optique croit régulièrement.

Ces courbes mettent en évidence la complexité du mécanisme de la déshydratation. La transformation du rétinol en anhydrorétinol se déroule régulièrement pendant une durée qui est directement en rapport avec la concentration en H Cl, puis la déshydratation du rétinol s'arrête et, finalement, l'anhydrorétinol formé disparait à son tour.

c) Déshydratation du rétinol par l'acide chlorhydrique en solution dans l'éthanol à 95 %

Si la formation de l'anhydrovitamine A est une simple déshydratation, la présence d'eau dans le milieu doit inhiber la réaction; pour le vérifier, nous avons repris les mêmes expériences dans l'éthanol à 95 %.

Les courbes de la figure (9) représentent comme précédemment en ordonnée les modifications de la densité optique à 390 mμ en fonction du temps exprimé en minutes et de la concentration en H Cl du milieu éthanol à 95 % d'une solution de rétinol renfermant 100 μg/ml.

Résultats -

La formation de l'anhydrorétinol est fortement ralentie dans un milieu renferman de l'eau. Les solutions chlorhydriques 0,005 N et 0,0025 N déshydratent encore le rétinol à une vitesse appréciable mais l'action de solutions 0,00125 N en H Cl est peu sensible. En comparant la déshydratation dans l'éthanol pur à celle dans l'éthanol 95 % (fig. 7 et 9), nous constatons qu'en utilisant des solutions acides de même concentration, les densités optiques sont environ 5 fois plus faibles si le milieu renferme de l'eau.

Des résultats comparables sont obtenus avec des solutions de rétinol renfermant 5 µg/ml et il ne nous a pas paru nécessaire de continuer dans cette voie.

L'étude de l'évolution de la densité optique met en évidence trois phases dans la déshydratation du rétinol en milieu polaire. La concentration en anhydrorétinol croit régulièrement, puis reste stationnaire et enfin diminue, donc l'anhydrorétinol se forme, se détruit ou se transforme.

La durée de ces trois phases est en rapport avec la concentration en acide chlorhydrique et le degré d'hydratation du milieu. Plus les solutions éthanoliques sont acides, plus le déroulement est rapide, alors que l'eau joue un rôle inverse et diminue la vitesse de réaction.

En conclusion, la transformation du rétinol en anhydrorétinol dépend de la concentration en acide chlorhydrique, de la durée de l'expérience et de la teneur en eau du milieu mais, en raison de l'instabilité du composé formé, l'étude cinétique semble très difficile.

II - TRANSFORMATION DE L'ACETATE DE RETINOL EN ANHYDRORETINOL EN MILIEU POLAIRE PAR ACTION DE L'ETHANOL CHLORHYDRIQUE .

Nous avons ensuite étudié la transformation de l'acé-

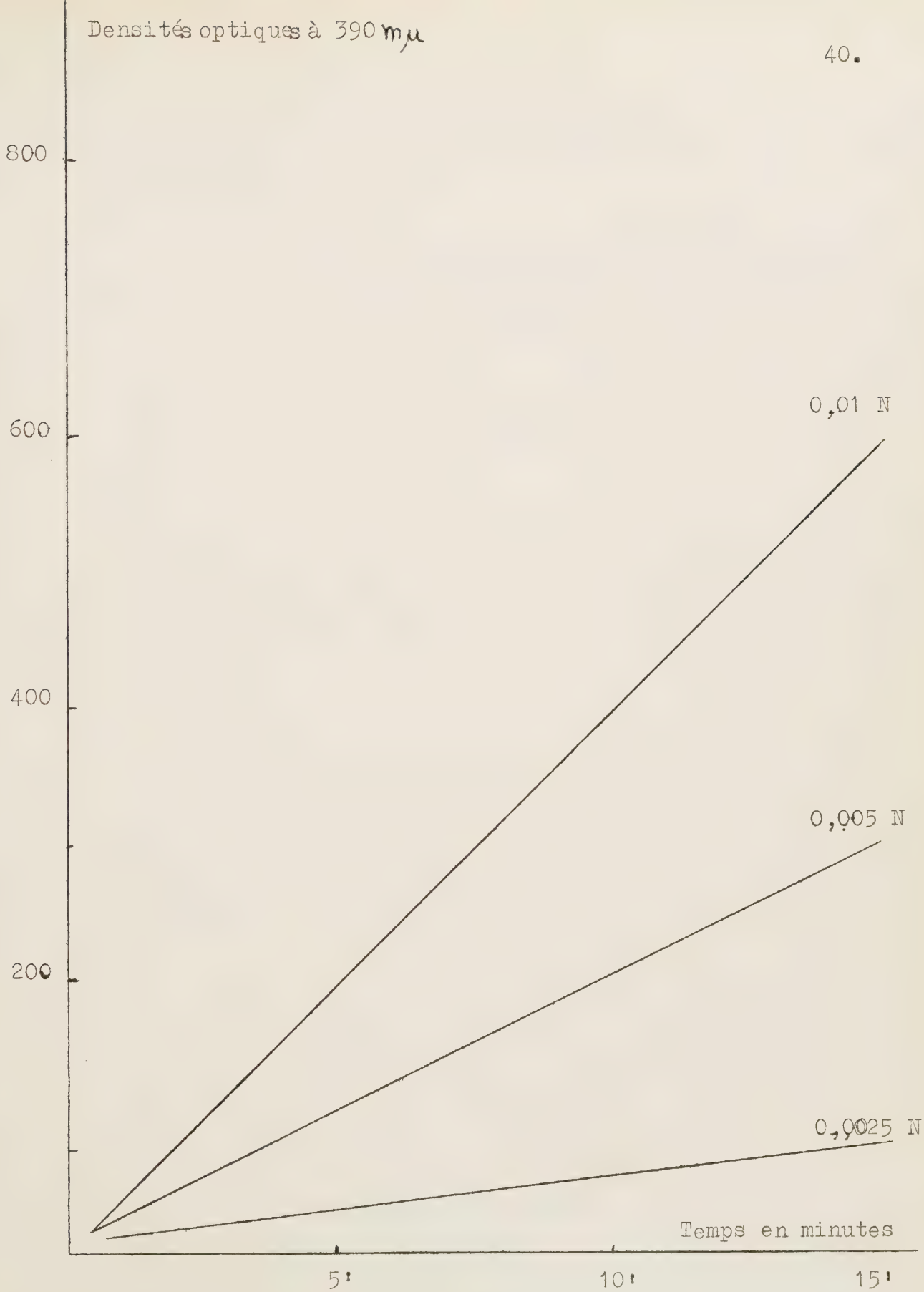


FIGURE 10

Formation d'anhydrorétinol à partir d'une solution d'acétate de rétinol renfermant 100 μg /ml par des solutions 0,01, 0,005, 0,0025 N en H Cl

tate de rétinol de synthèse en anhydrorétinol avec les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour déshydrater l'alcool.

a) Action de l'éthanol chlorhydrique à différentes concentrations sur une solution renfermant 100 µg/ml d'acétate de rétinol

Nous avons opéré en présence d'un excès d'acétate de rétinol et suivi sa transformation en anhydrorétinol par action de solution d'éthanol chlorhydrique successivement 0,01, 0,005, 0,0025, 0,00125 N en H Cl.

Les courbes de la figure (10) représentent les modifications de la densité optique à 390 mµ d'une solution d'acétate de rétinol renfermant 100 µg/ml en fonction du temps exprimé en minutes, les lectures sont prolongées 15'.

Résultats -

Ainsi que le montrent les courbes de la figure (10), les solutions éthanoliques 0,01, 0,005, et 0,0025 N en H Cl transforment l'acétate de rétinol en anhydrorétinol; par contre, pendant la durée de l'expérience, les solutions 0,00125 N en H Cl ne sont pas assez actives pour permettre la mise en évidence de l'anhydrorétinol.

Si nous comparons les courbes 7 et 10, nous constatons que la formation de l'anhydrorétinol est plus lente à partir de l'acétate qu'à partir de l'alcool; pour obtenir des vitesses de réaction voisines, il faut utiliser des solutions 10 fois plus concentrées en acide.

La difficulté plus grande de transformer l'acétate de rétinol en anhydrorétinol nous a conduits, pour pouvoir comparer la courbe de formation de l'anhydrorétinol à celle obtenue à partir de l'alcool, à prolonger les expériences pendant 75 mi-

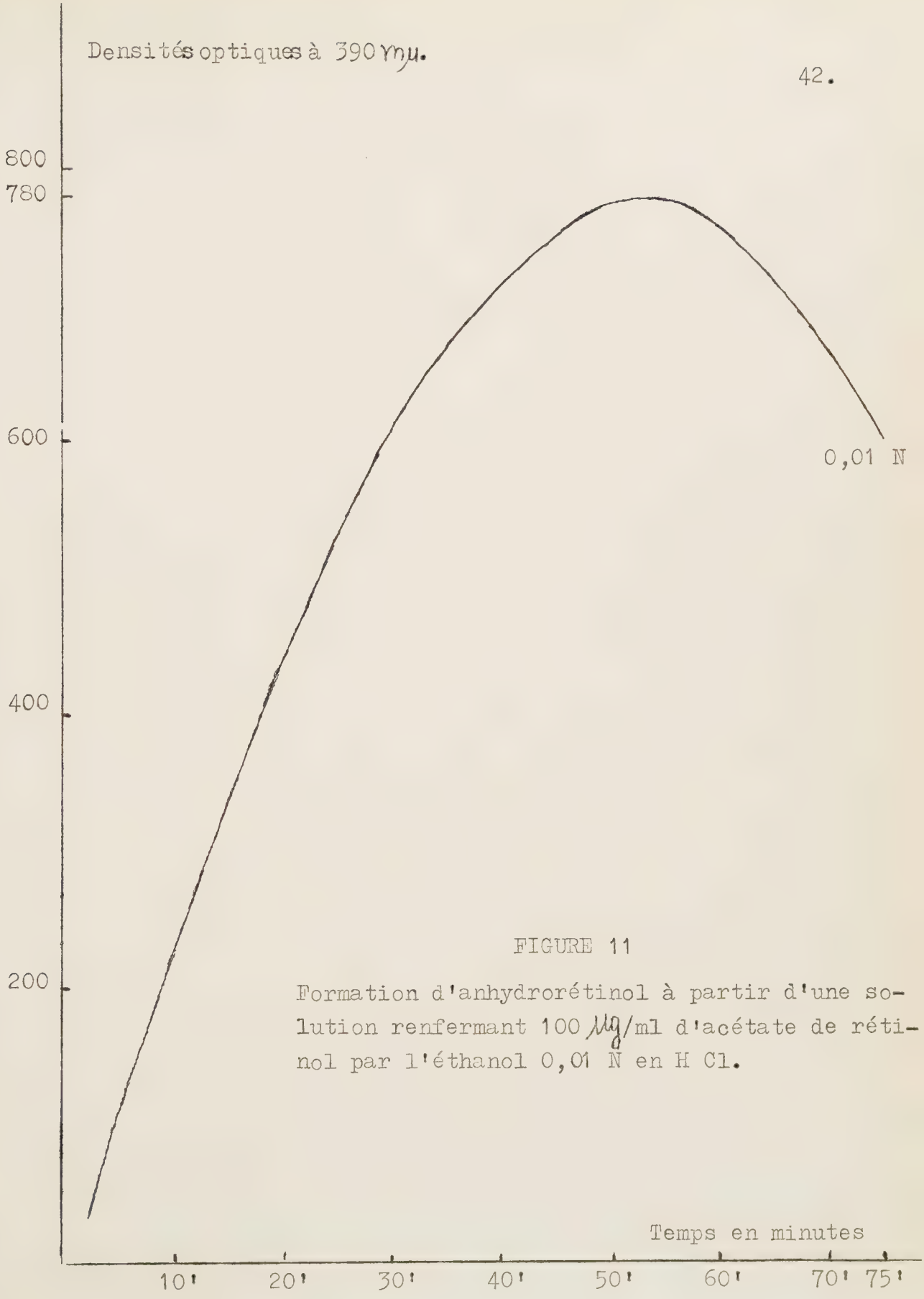


FIGURE 11

Formation d'anhydrorétinol à partir d'une solution renfermant 100 µg/ml d'acétate de rétinol par l'éthanol 0,01 N en H Cl.

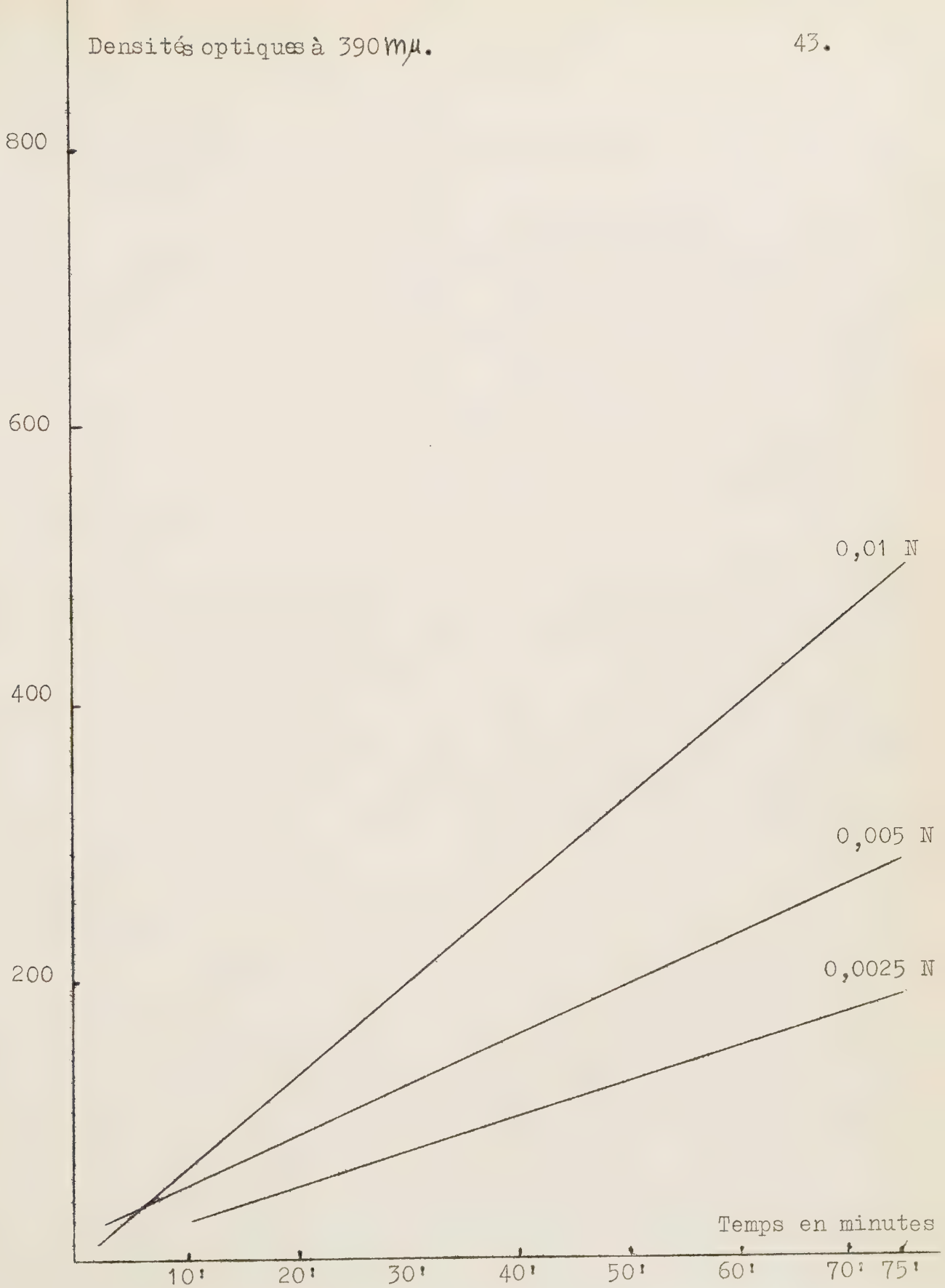


FIGURE 12

Formation d'anhydrorétinol à partir d'une solution renfermant 100 µg d'acétate de rétinol dans l'éthanol 95 %.

nutes et à utiliser une solution plus concentrée en acide chlorhydrique, à savoir 0,01 N.

Après examen de la figure (11) qui exprime les modifications de la densité optique à 390 mμ en fonction du temps d'une solution d'acétate de rétinol (100 μg/ml) dans l'éthanol acide 0,01 N en H Cl, nous constatons que la formation d'anhydrorétinol se poursuit pendant 45 minutes, la concentration reste stationnaire durant les 10 minutes suivantes puis décroit rapidement. Si la transformation de l'ester s'effectue plus difficilement que l'alcool, le mécanisme est le même, les courbes sont superposables.

b) Transformation de l'acétate de rétinol en anhydrorétinol par l'acide chlorhydrique en solution dans l'éthanol à 95 %

Nous avons étudié la formation de l'anhydrorétinol à partir d'une solution d'acétate de rétinol renfermant 100 μg/ml dans l'éthanol à 95 % en présence de concentration en acide 0,01, 0,005, 0,0025 N en H Cl. Les lectures sont prolongées 75 minutes (fig. 12).

Résultats -

Les résultats de la figure (12) montrent que pendant 75 minutes la densité optique à 390 mμ d'une solution d'acétate de rétinol dans l'éthanol 0,01 N en H Cl croit régulièrement. Nous observons seulement la première phase de la réaction, la présence d'eau dans le milieu diminuant fortement la vitesse de formation de l'anhydrorétinol.

Les solutions d'éthanol 95 %, 0,005 N et 0,0025 N en H Cl transforment également l'acétate de rétinol en anhydrorétinol, mais très lentement.

En conclusion -

L'éthanol chlorhydrique transforme l'acétate de rétinol en anhydrorétinol, la réaction se déroule en trois phases, la concentration du corps formé augmente puis reste stationnaire, enfin décroit; la vitesse de réaction est ralentie par la présence d'eau.

Ces observations montrent le parallélisme entre la formation de l'anhydrorétinol soit à partir de l'alcool soit à partir d'un ester, mais l'acétate est plus stable vis à vis du déshydratant étudié.

DISCUSSION -

1°/- Les expériences d'EDISBURY (18) avaient mis en évidence la transformation quasi immédiate de la vitamine A_1 par l'acide chlorhydrique en anhydrovitamine A_1. Pour essayer de calculer cette vitesse de réaction, nous avons utilisé des solutions très faibles en acide, et avons constaté que la déshydratation du rétinol et de l'acétate de rétinol se déroule en trois phases : la concentration s'élève, reste stationnaire et décroit, ce qui laisse supposer qu'il y a destruction ou transformation à la fois du substrat et du produit formé, et nous avons été amenés à envisager de nouveau ce problème après une étude quantitative de la réaction.

2°/- En ce qui concerne le mécanisme chimique, deux points importants sont à souligner; le rôle de l'acide chlorhydrique et le rôle du solvant.

Rôle de l'acide chlorhydrique

Des expériences furent faites par HIGUCHI et REINSTEIN (32) avec de l'acide perchlorique comme agent catalyseur dans un milieu éthanol 100 %. Bien que l'acide perchlorique soit intrinsèquement un acide plus fort que l'acide chlorhydrique, le

taux de formation de l'anhydrovitamine A_1, à partir de la vitamine A_1 est moindre dans le système catalysé par l'acide perchlorique que dans le système catalysé par l'acide chlorhydrique.

HIGUGHI et REINSTEIN constatant également que la réaction est plus lente dans un milieu hydro-alcoolique où H Cl est complètement ionisé, concluent que le catalyseur est non le proton H^+, mais la molécule H Cl non dissociée.

Il nous semble difficile d'admettre totalement ces conclusions, la déshydratation du rétinol, comme le souligne MEUNIER (47) étant liée à son ionisation et à la formation du cation "axérophtyle" la réaction ne peut se produire que dans un milieu acide et avec un solvant donneur d'électron (MEUNIER). Il est donc probable que le solvant participe intimement à la réaction ce qui nous conduit à envisager son rôle.

Rôle du solvant -

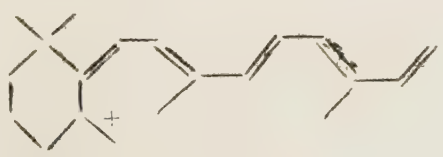
Tout d'abord en milieu acide, la molécule de rétinol s'ionise :

$$(R^1) . CH^2 . O^+ . H \quad Cl^- . H$$

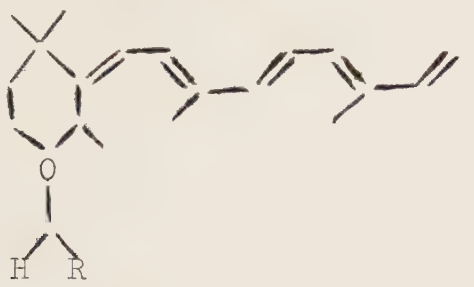
mais cet "oxonium" instable aboutit à l'une ou l'autre des structures suivantes où l'oxygène a repris sa neutralité électrique :

$$R^1 - CH^2 - O^{(+)} H \quad \text{ou} \quad R^1 - CH^2 - {}^{(+)}O - H$$

La seconde formule entraine une migration des doubles liaisons conjuguées du rétinol.



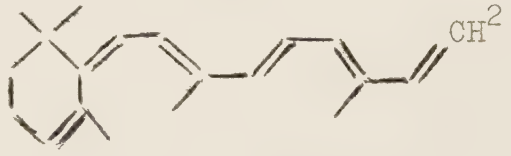
Dans un solvant donneur d'électron (R. OH) l'ion peut être représenté ainsi :



+ (O - H)

Sous l'influence de l'anion OH provenant du rétinol, l'ion "axérophtyl" aura tendance à perdre un proton provenant d'un carbone stable; le plus indiqué, à cet égard, est certainement le carbone 4 voisin du carbone 5 dont l'acétate est disloqué par la liaison à l'oxygène du solvant. La perte d'un des protons du carbone 4 rend immédiatement disponible un doublet électronique capable de chasser le solvant R _ OH par établissement d'une double-liaison en 4 - 5. Finalement, à l'édifice électronique instable précédent, nous pouvons substituer l'ensemble des trois corps neutres suivants :

$O H_2$ + $C_2 H_5 O H$ +



anhydrovitamine A_1

Après ce mécanisme possible de formation de l'anhydrovitamine A_1 formulé par MEUNIER (47), on peut également supposer qu'en milieu acide, après ionisation du rétinol et de l'acide éthylique, il se forme un éther de formule :

$$(R_1) - CH_2 - O - (C_2 - H_5)$$

qui, en milieu acide, se trouve dissocié par l'action du proton H^+, et le cation reprend sa neutralité électrique par perte d'un proton en α ce qui entraine un changement de position des double-liaisons et la création d'une double-liaison supplémentaire selon un mécanisme de déshydratation des alcools en milieu acide.

La participation possible du solvant à la réaction explique la diminution de la vitesse de la réaction dans le milieu éthanol 95 %. C'est après l'étude de la formation de l'anhydrorétinol en milieu non polaire que nous essayerons de préciser ces problèmes.

1ère PARTIE

CHAPITRE 4

ETUDE DE LA FORMATION DE L'ANHYDRORETINOL A PARTIR DU RETINOL OU DE L'ACETATE DE RETINOL "IN VITRO" PAR ACTION DU SULFATE DE ZINC

Nous avons constaté et décrit au chapitre 2 la déshydratation possible du rétinol et de l'acétate de rétinol en milieu non polaire par action du sulfate de zinc et nous avons montré l'avantage de ce procédé qui permet d'isoler par chromatographie l'anhydrorétinol pur. Nous allons étudier maintenant la formation de l'anhydrorétinol, soit à partir du rétinol, soit à partir du l'acétate de rétinol en nous rapprochant le plus possible des conditions décrites lors de la déshydratation par l'éthanol chlorhydrique; dans un deuxième temps, à l'aide de la chromatographie, nous isolerons successivement l'anhydrorétinol formé, le rétinol restant, et rechercherons si d'autres corps se forment au cours de la réaction.

1°/- DESHYDRATATION D'UNE SOLUTION RENFERMANT 100 µg/ml DE RETINOL PAR LE SULFATE DE ZINC DESSECHE

Le premier sel utilisé est le sulfate de zinc déshydraté par un séjour d'environ 6 heures à l'étuve à 100°.

Protocole expérimental -

Le sulfate de zinc desséché utilisé à la concentration de 2 % est placé directement dans la cuve de 1 cm. du spectrophotomètre de BECKMAN renfermant la solution de rétinol et de tocophérol dans l'éther de pétrole, les modifications de la densité optique à 390 mµ sont suivies en fonction du temps.

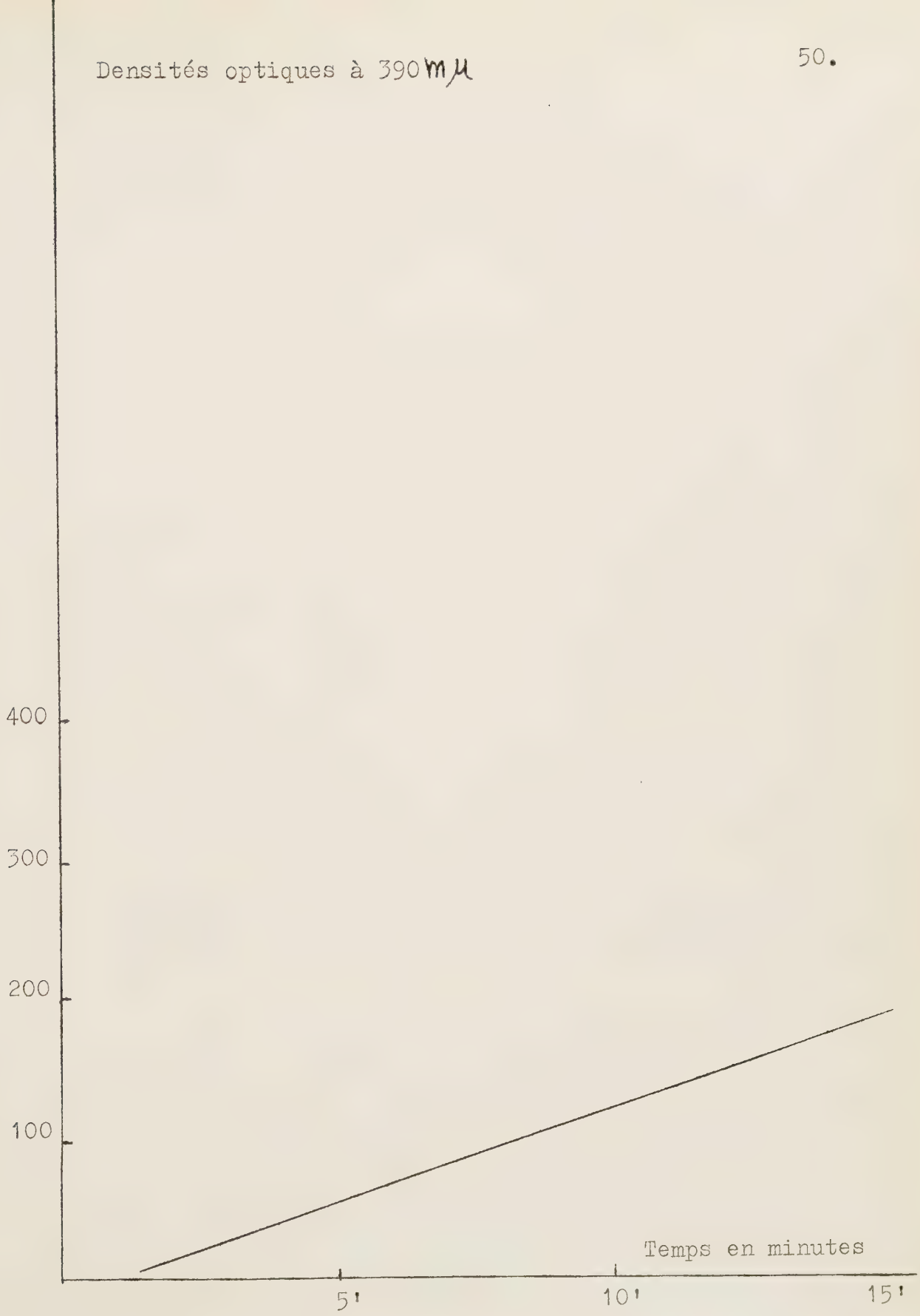


FIGURE 13

Déshydratation du rétinol (100 μg/ml) en solution dans l'éther de pétrole par SO^4 Zn déssèché 2 %.

La courbe de la figure (13) représente l'évolution de la densité optique à 390 mμ en fonction du temps exprimé en minutes d'une solution de rétinol dans l'éther de pétrole renfermant 100 μg/ml.

Résultats -

L'examen de la figure (13) montre la transformation progressive du rétinol en anhydrorétinol par action du sulfate de zinc. Pendant 15 minutes le tracé de l'évolution de la densité optique se présente sous forme d'une droite. Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus par action de l'éthanol chlorhydrique (figure 7) nous constatons que l'action déshydratante du sulfate de zinc desséché à la concentration de 2 % est inférieure à celle d'une solution acide 0,00125 en H Cl, la densité optique à 390 mμ est environ la moitié de celle obtenue avec la solution acide.

Nous avons reproduit l'expérience avec une solution de rétinol (5 μg/ml) mais la formation d'anhydrorétinol est trop faible pour que les résultats soient intéressants.

2°/- TRANSFORMATION D'UNE SOLUTION RENFERMANT 100 μg/ml D'ACETATE DE RETINOL EN ANHYDRORETINOL, PAR LE SULFATE DE ZINC DESSECHE

La solution d'acétate de rétinol dans l'éther de pétrole (100 μg/ml) renfermant du tocophérol est placée directement dans la cuve de 1 cm. du spectrophotomètre de BECKMAN en présence de sulfate de zinc desséché à la concentration de 2 %.

Les lectures sont faites régulièrement pendant 60 minutes et sont portées sur la figure (14) où sont notées en abscisses les densités optiques et en ordonnées les temps exprimés en minutes.

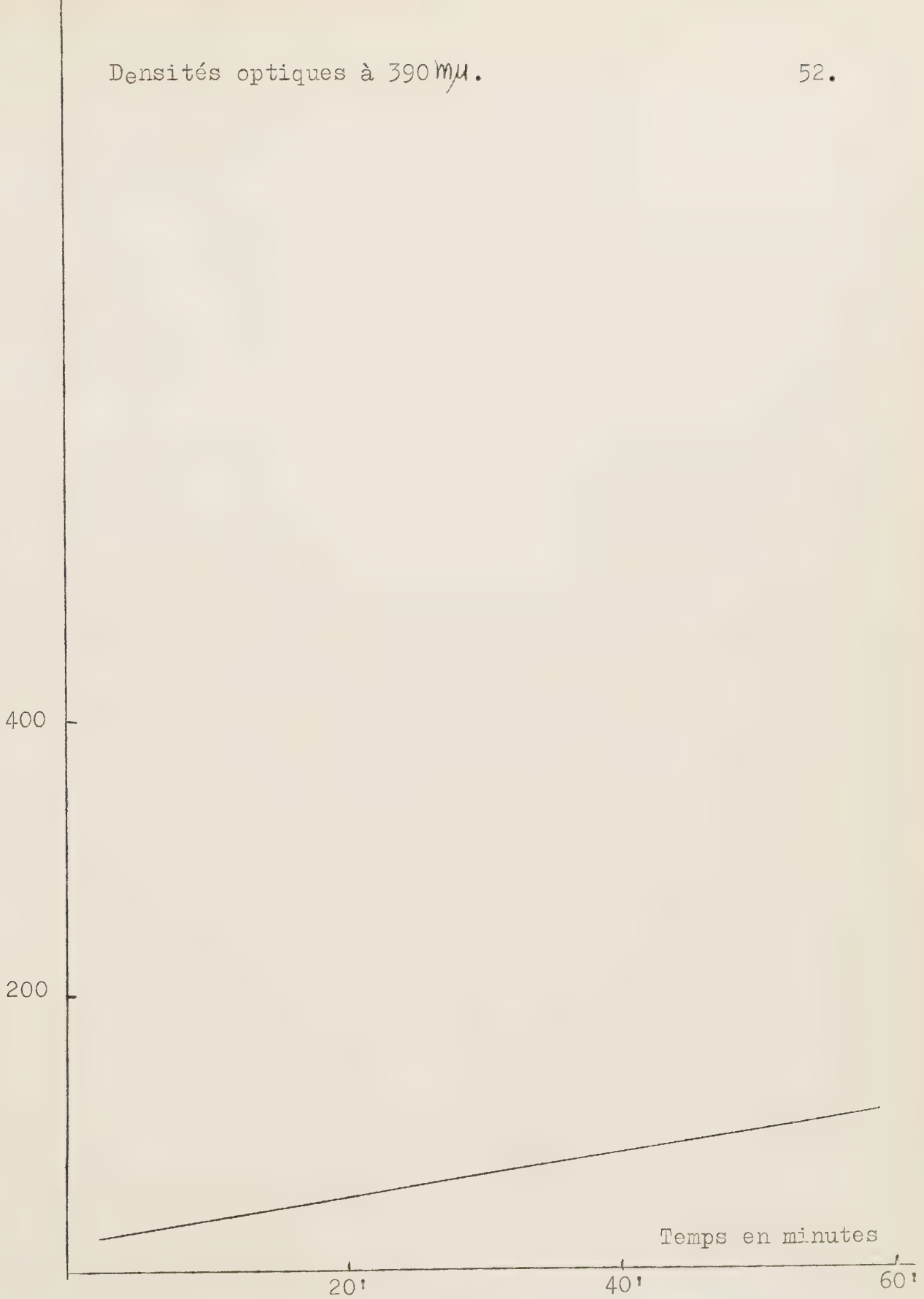


FIGURE 14

Transformation de l'acétate de rétinol (100 μg /ml) en anhydro-rétinol par SO^4 Zn desséché à la concentration de 2 %.

Résultats -

Nous constatons que l'acétate de rétinol se transforme très lentement en anhydrorétinol. Le tracé de l'évolution de la densité optique est une droite, mais nous avons prolongé les lectures pendant 60 minutes pour que la formation de l'anhydrorétinol soit plus apparente.

Le sulfate de zinc hydraté est pratiquement sans action sur l'acétate de rétinol dans des expériences de durée raisonnable (il faut attendre 20 jours pour voir apparaitre l'anhydrorétinol).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'éthanol chlorhydrique; dans les deux cas, l'acétate se déshydrate beaucoup plus difficilement que l'alcool, ce qui nous a conduits pour étudier la réaction de formation de l'anhydrorétinol à utiliser plus spécialement la forme de la vitamine A_1 la plus directement transformable, à savoir l'alcool.

3°/- DESHYDRATATION DU RETINOL PAR LE SULFATE DE ZINC A DIFFERENTS DEGRES D'HYDRATATION

L'intérêt de la technique de préparation de l'anhydrorétinol en milieu non polaire par action du sulfate de zinc est de pouvoir utiliser un déshydratant doux, très maniable, qu'il suffit de déssécher plus ou moins pour modifier son activité. En présence du sulfate de zinc 7 OH_2, la déshydratation se produit lentement et permet d'isoler chaque jour l'anhydrorétinol formé, le rétinol non transformé et éventuellement d'autres corps formés dans la réaction. A l'aide de cette technique, nous avons essayé d'éliminer les difficultés rencontrées précédemment et détudier la formation d'anhydrorétinol d'un point de vue quantitatif.

A/- Action du Sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé

Protocole expérimental -

Dans un flacon, jaugé à 100 ml, nous introduisons 100 ml d'une solution de rétinol et de tocophérol dans l'éther de pétrole renfermant 100 µg/ml de rétinol et nous y ajoutons 2 % de SO_4 Zn 7 OH_2 pulvérisé.

Pendant trente jours, nous procédons, chaque jour, à la chromatographie sur 2 grammes d'alumine de 1 ml de cette solution diluée au 1/5 de façon à ce que 1 ml corresponde à 20 µg de rétinol. Les densités optiques sont lues de 250 à 400 mµ pour chacun des tubes de la chromatographie. Les chiffres donnés dans les tableaux III et IV représentent la somme des densités optiques des tubes ayant le même spectre d'absorption.

Etude de la réaction de déshydratation du rétinol -

1/- Eluant : éther de pétrole

Cette fraction renferme l'anhydrovitamine A_1 ; nous donnons dans le tableau II ses trois maxima caractéristiques à 350 - 368 et 390 mµ afin de mettre en évidence la pureté du corps isolé.

2/- Eluant : éther de pétrole renfermant 1 % de méthanol

Cette fraction renferme le rétinol.

Le tableau IV montre les modifications de la densité optique à 325 mμ chaque jour.

TABLEAU III

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do à 350mμ 368 mμ et 390mμ A PARTIR DE 20 μg /ml DE RETINOL EN PRESENCE DE SULFATE DE ZINC 7 OH_2 PULVERISE

	DUREE DE L'EXPERIENCE EN JOURS									
	0	1	2	3	4	5	10	15	20	30
Do à 350 mμ		0,200	0,350	0,485	0,630	0,750	0,800	0,845	0,805	0,553
Do à 368mμ		0,291	0,516	0,710	0,910	1,010	1,116	1,233	1,176	0,803
Do à 390 mμ	0	0,254	0,450	0,620	0,800	0,954	1,010	1,075	1,025	0,700

TABLEAU IV

EVOLUTION DU RETINOL 20 μg /ml EXPRIME EN Do à 325 mμ EN PRESENCE DE SULFATE DE ZINC 7 OH^2 PULVERISE

	DUREE DE L'EXPERIENCE EN JOURS									
	0	1	2	3	4	5	10	15	20	30
Do à 325mμ	3,505	2,810	2,200	2,040	1,910	1,805	1,000	0,200	0	0

L'examen des densités optiques à 350 - 368 et 390mμ portées sur le tableau III montre la présence d'anhydrorétinol pur formé par action du sulfate de zinc isolé après chromatographie sur alumine.

D'autre part, la concentration en anhydrorétinol s'élève pendant les cinq premiers jours, reste sensiblement stationnaire entre le cinquième et le vingtième jour et décroit ensuite. Nous retrouvons les trois phases du mécanisme déjà mis en évidence lors de la formation d'anhydrorétinol par action de l'éthanol chlorhydrique.

L'examen du tableau IV est aussi très significatif : il permet de suivre le comportement du rétinol en présence de sulfate de zinc. La densité optique à 325 mμ diminue rapidement entre le début de l'expérience et le premier jour, lentement et régulièrement entre le premier et le cinquième jour, puis la disparition du rétinol s'accélère et le quinzième jour il ne subsiste que des traces de rétinol dans la solution.

Si nous comparons les résultats des tableaux III et IV, nous constatons que l'abaissement du taux de rétinol en un jour est trop important par rapport à l'anhydrorétinol formé, qu'entre le premier et le cinquième jour la formation régulière d'anhydrorétinol correspond à la déshydratation du rétinol, mais que dès le cinquième jour la destruction rapide du rétinol limite la formation de l'anhydrorétinol.

Lorsque le rétinol commence à disparaitre de la solution, il apparait un nouveau corps, dont le spectre d'absorption dans l'ultra-violet présente 3 maxima situés respectivement à 330 - 350 et 370 mμ et dont la concentration s'élève régulièrement entre le cinquième jour et la fin de l'expérience. Ainsi que le laisse supposer son spectre d'absorption (Tableau IV) cette substance est l'isovitamine A_1, déjà obtenue par EMBREE (19) en prolongeant l'action de l'acide chlorhydrique sur le rétinol, elle commence à se former dès la destruction du rétinol.

Entre le cinquième et le quinzième jour, une fraction de rétinol se détruit, une autre se déshydrate, mais l'anhydrorétinol ne reste pas stable, il se transforme à son tour en isovitamine A_1 ou réhydrorétinol. Entre le vingtième et le

trentième jour, nous constatons que deux phénomènes se superposent et expliquent la diminution de l'anhydrorétinol : la destruction accélérée du rétinol, et la transformation de l'anhydrorétinol en isovitamine A_1 ou rehydrorétinol.

TABLEAU V

FORMATION D'ISOVITAMINE A_1 CARACTERISEE PAR SON SPECTRE D'ABSORPTION

DENSITES OPTIQUES

	370 mμ	350 mμ	330 mμ
0 jour	0	0	0
1 jour	0	0	0
5 jours	0,408	0,591	0,607
15 jours	0,441	0,611	0,627
20 jours	0,470	0,664	0,690
30 jours	0,541	0,724	0,735

B/- Action comparative de trois sulfates de zinc à différents degrés de cristallisation

Nous avons repris la même expérience en utilisant en plus le sulfate de zinc 7 OH_2 cristallisé et le sulfate de zinc déshydraté.

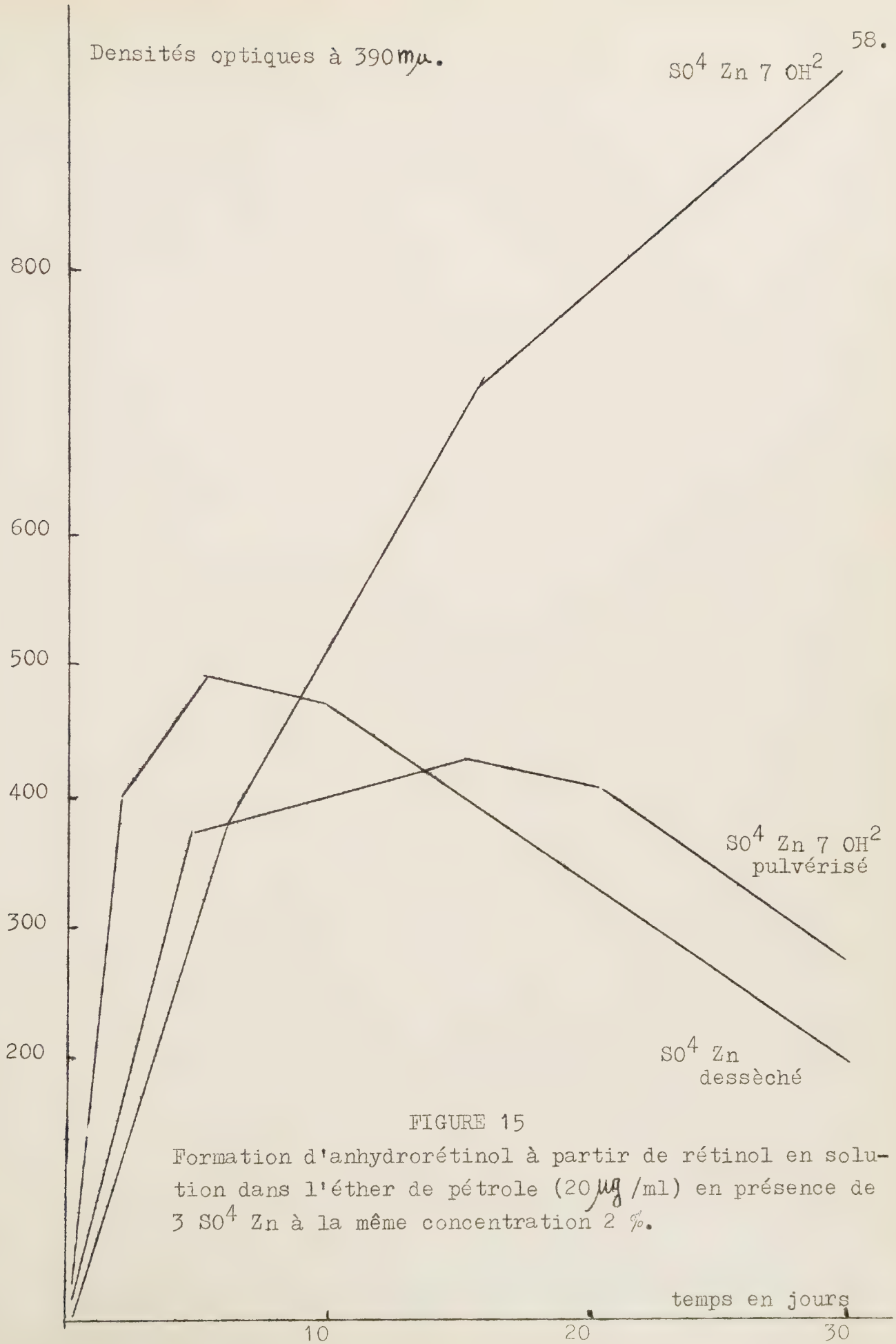


FIGURE 15

Formation d'anhydrorétinol à partir de rétinol en solution dans l'éther de pétrole (20 μg /ml) en présence de 3 SO^4 Zn à la même concentration 2 %.

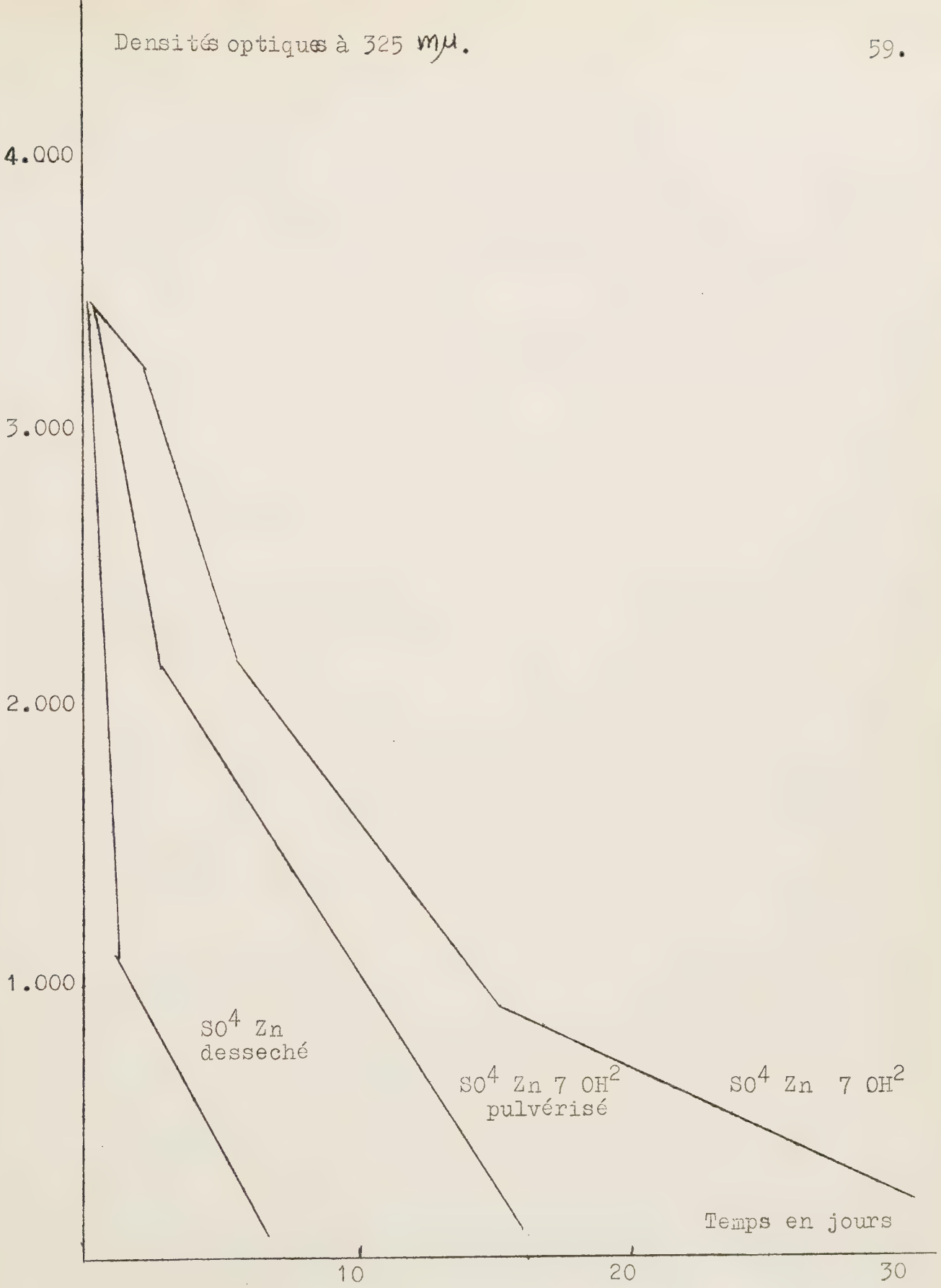


FIGURE 16

Disparition du rétinol (exposé en Do à 325 mμ) à partir d'une solution renfermant (20 μg/ml) en présence de 3 sulfate de zinc.

Dans la figure (15) nous suivons, après isolement de l'anhydrorétinol par chromatographie, les modifications de la densité optique à 390mμ pendant 30 jours de trois solutions de rétinol (20μg/ml) et de tocopherol dans l'éther de pétrole, chacune en présence d'un sulfate de zinc différent, le sel à 7 OH_2, le sel à 7 OH_2 pulvérisé, le sel déshydraté.

La figure 16 montre l'évolution de la densité optique à 325mμ caractéristique du rétinol isolé par chromatographie dans les mêmes conditions.

Résultats -

1/- Anhydrorétinol

En présence de sulfate de zinc à 7 OH_2 la formation de l'anhydrorétinol est rapide pendant 15 jours, puis plus lente entre le quinzième et le trentième jour.

Le sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé a, pendant les cinq premiers jours, une action déshydratante très voisine du sel non pulvérisé, entre le cinquième et le quinzième jour, la formation de l'anhydrorétinol se ralentit, puis l'anhydrorétinol formé disparait, lentement entre le quinzième et le vingtième jour, rapidement du vingtième au trentième jour.

Avec le sel déshydraté, nous retrouvons le même déroulement de la réaction, maisaccéléré, la formation est rapide pendant les deux premiers jours, ralentie entre le deuxième et le cinquième jour, et l'anhydrorétinol disparait entre le cinquième et le quinzième jour.

2/- Rétinol

La disparition du rétinol est plus ou moins rapide, suivant la force du déshydratant utilisé; avec le sel desséché il n'y a plus de rétinol dès le cinquième jour; il en persiste jusqu'au quinzième jour avec le sel pulvérisé et jusqu'au trentième jour avec le sel cristallisé non pulvérisé.

C/- Déshydratation par le sulfate de zinc : étude quantitative

L'isolement par chromatographie des corps entrant en jeu dans la réaction, nous a permis de suivre quantitativement le mécanisme de la transformation du rétinol en anhydrorétinol. Le tableau VI résume d'une part la disparition du rétinol, dont la concentration fut calculée par l'absorption à 325 mμ en fonction de la valeur de E 1% / 1 cm = 1.750 et la formation de l'anhydrorétinol, calculée en fonction de l'absorption à 390 mμ la valeur de E 1% / 1 cm = 3.180 à cette longueur d'onde pour une solution renfermant 100 μg /ml de rétinol en présence soit de SO_4 Zn 7 OH_2, soit de SO_4 Zn 7 OH_2 pulvérisé, soit de SO_4 Zn desséché.

TABLEAU VI

DISPARITION DU RETINOL (exprimé en μg par ml) - FORMATION D'ANHYDRORETINOL (exprimé en μg par ml) A PARTIR D'UNE SOLUTION DANS L'ETHER DE PETROLE RENFERMANT 100 μg par ml DE RETINOL EN PRESENCE DE SULFATE DE ZINC 7 OH_2 - 7 OH_2 PULVERISE ET DESHYDRATE

		TEMPS EN JOURS						
		0	1	2	5	15	20	30
SO^4 Zn 7 OH_2	Rétinol	100	95	92,5	63,5	25,5	20	5,5
	Anhydrorétinol	0	2,5	4	1,5	27,5	31,5	37,5
SO_4 Zn 7^4OH_2 pulvérisé	Rétinol	100	80	62,5	23	5,5	0	0
	Anhydrorétinol	0	4	5,6	15	17,5	16	10
SO_4 Zn déshydraté	Rétinol	100	35	20	10	0	0	0
	Anhydrorétinol	0	8	9,6	20	19	13	8

Résultats -

1/- Action du sulfate de zinc cristallisé -

Le cinquième jour 25 % du rétinol est détruit, mais jusqu'au trentième jour le rétinol persiste dans la solution. Finalement 35 % environ se transforment en anhydrorétinol.

2/- Action du sulfate de zinc cristallisé pulvérisé

Dès le cinquième jour, 60 % du rétinol a disparu, ce qui entraine un rendement plus faible en anhydrorétinol que dans le cas précédent.

C'est le quinzième jour où nous trouvons la plus forte concentration en anhydrorétinol où environ 15 % du rétinol est déshydraté.

3/- Action du sulfate de zinc desséché

La destruction du rétinol est quasi immédiate et se produit dès le premier jour où 75 % du rétinol a disparu, ce qui entraine une formation plus rapide mais moins intense d'anhydrorétinol, la concentration maxima se retrouve le quinzième jour où seulement 20 % de rétinol est déshydraté.

En résumé, 100 µg de rétinol devraient conduire à 98,5 µg d'anhydrorétinol, mais la concentration la plus forte obtenue, et cela avec le sulfate de zinc le moins actif, est de 37,5 µg. Une part importante de rétinol disparait en présence de déshydratants. Cette destruction est brutale, elle se produit dès la mise en route de l'expérience, puis il y a à la fois destruction plus lente et déshydratation. Lorsque la vitesse de destruction devient trop importante, le rétinol n'est plus susceptible de se déshydrater. Nous avons reproduit parallèlement la disparition du rétinol exprimé en µg /ml et la formation d'anhydrorétinol pendant 30 jours à partir de 100 µg/ml de rétinol en présence de SO_4 Zn 7 OH_2 pulvérisé (figure 17).

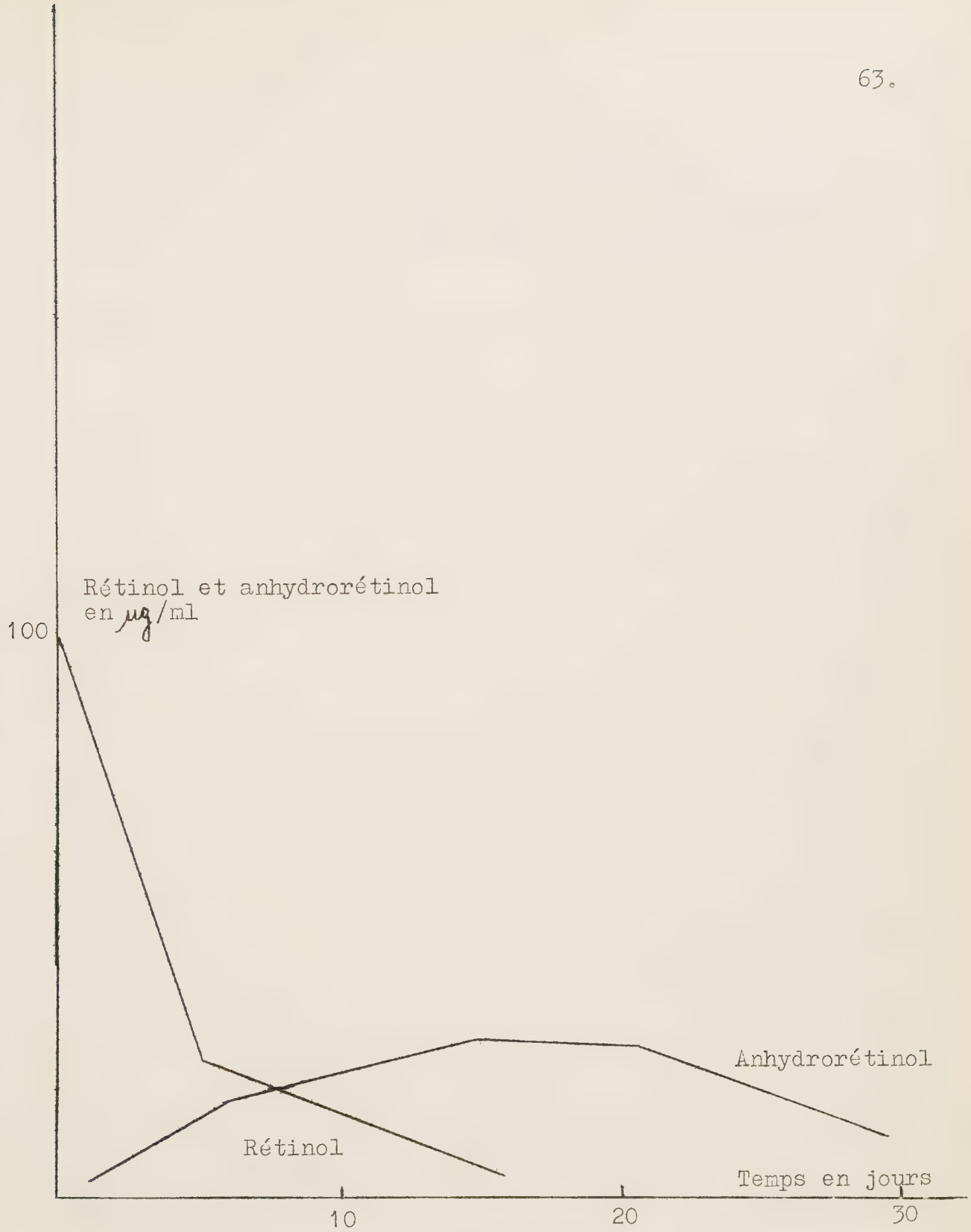


FIGURE 17

Disparition du rétinol et formation d'anhydrorétinol parallèlement pendant 30 jours

Nous insistons sur les écarts entre ces deux courbes, pour bien mettre en évidence le faible rendement en anhydrorétinol dû à un phénomène très important : la destruction du rétinol en présence de déshydratants. Paradoxalement, plus le sulfate de zinc est actif moins il se forme d'anhydrorétinol.

Remarque -

A la suite de ces résultats nous avons essayé de déshydrater le rétinol par d'autres sels possèdant des propriétés déshydratantes, et avons constaté que le sulfate de sodium anhydre, le sulfate de magnésium anhydre, ne déshydratent pas le rétinol, par contre les sulfates de cadmium et de strontium détruisent très rapidement le rétinol en solution dans l'éther de pétrole.

Discussion -

Plus la réaction de déshydratation est lente, plus la formation d'anhydrorétinol se poursuit longtemps, la réaction est limitée par la destruction du rétinol qui est très rapide si le déshydratant est actif. Pendant la première phase de transformation du rétinol, la vitesse de formation de l'anhydrovitamine A est assez peu différente avec les trois sels utilisés, seule la longueur de cette phase est en rapport avec le déshydratant; plus le déshydratant est actif, plus la phase est courte; mais dans les trois cas la vitesse de déshydratation est toujours rapide puis plus lente.

Dès que l'anhydrorétinol ne se forme plus, il disparait pour se transformer en réhydrorétinol ou isovitamine A_1, isolé par chromatographie et mis en évidence par son spectre dans l'ultra-violet.

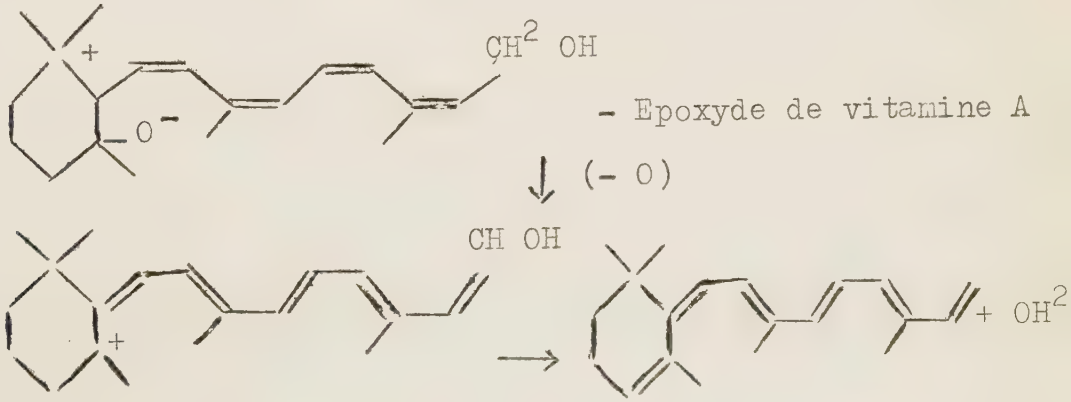
Nous comprenons, maintenant, les trois étapes mises en évidence lors de la formation d'anhydrorétinol en milieu polaire.

La première phase correspond à une déshydratation du rétinol avec formation régulière d'anhydrorétinol; durant la deuxième phase, la destruction du rétinol entraine un arrêt de la formation de l'anhydrorétinol, puis l'anhydrorétinol se transforme en isovitamine A_1, ou réhydrorétinol.

L'étude cinétique devient impossible; il y a à la fois destruction du substrat et disparition du produit formé dans la réaction.

La déshydratation du rétinol en milieu non polaire par un sel insoluble mais à caractère acide, laisse supposer que le mécanisme de formation de l'anhydrorétinol dans ces conditions est analogue au comportement du rétinol sur les terres acides; MEUNIER (47). Sous l'action du sulfate de zinc, il se produit une ionisation du rétinol, suivie d'une déshydratation, le sulfate de zinc se conduisant comme un accepteur de OH_2.

MEUNIER (47) suppose un passage direct de la vitamine A_1 à l'anhydrovitamine A_1. A la suite de travaux récents, PANCRAZIO et VITALI (64) ont constaté que la transformation de la vitamine A_1 en anhydrovitamine A_1 dépend principalement du rapport $\frac{O}{\text{vit.A}}$ et peut se produire simultanément dans des ampoules scellées même en l'absence de catalyseur acide. A la suite de ces observations, ils émettent l'hypothèse d'une oxydation préalable de la vitamine A suivie d'une déshydratation.



Anhydrovitamine A

Sans rejeter ce mécanisme, nous n'avons jamais mis en évidence l'époxyde de vitamine A_1 dans nos solutions, d'autre part, nous utilisons toujours une solution de vitamine A_1 renfermant du tocophérol, pour prévenir une transformation spontanée de la vitamine A en époxyde.

EN CONCLUSION -

La déshydratation du rétinol peut se produire en milieu acide en solution dans un solvant hydroxylique ou en milieu non polaire par action d'un sel qui est à la fois acide et accepteur d'eau.

La déshydratation se produit très facilement "in vitro" avec des solutions chlorhydriques ou avec du SO_4 Zn même cristallisé avec 7 OH_2.

Le rétinol est peu stable dans ces conditions et il se détruit très rapidement au cours de l'expérience, cette destruction entraine un rendement très faible en anhydrorétinol.

La transformation du rétinol en anhydrorétinol se déroule en trois phases; une phase de formation plus ou moins longue, suivant l'activité du déshydratant, ce qui entraine avec un déshydratant doux une concentration en anhydrorétinol plus élevée, une phase où la concentration reste stationnaire puis survient la transformation de l'anhydrorétinol en réhydrorétinol ou isovitamine A_1.

En milieu polaire et en milieu non polaire, l'acétate de rétinol se transforme beaucoup plus difficilement que la forme alcool en anhydrorétinol comme nous avons supposé que la réaction conduisant à l'anhydrorétinol était précédée de l'ionisation de la molécule, il semble probable que la liaison R - O - OC H^3 C est plus stable que R - OH.

CONCLUSION DE LA 1ère PARTIE -

Le rétinol se transforme très facilement en anhydrorétinol. La vitesse de transformation du rétinol dépend de la concentration de l'éthanol en acide chlorhydrique. Nous avons constaté que la vitesse de déshydratation diminuait et devenait mesurable avec des solutions d'acide chlorhydrique gazeux dans l'éthanol pur à des concentrations décroissantes en acide chlorhydrique (0,005 N, 0,0025 N etc...). La réaction devient encore beaucoup plus lente en opérant dans des solutions d'éthanol à 95 %.

Ayant constaté l'extrême facilité avec laquelle le rétinol se transforme en anhydrorétinol, nous avons étudié l'action du sulfate de zinc, du sulfate de sodium anhydre et du sulfate de magnésium anhydre sur le rétinol de synthèse en solution dans les solvants non polaires, comme l'éther de pétrole. Le sulfate de sodium anhydre, le sulfate de magnésium ne déshydratent pas le rétinol; par contre, le sulfate de zinc se montre un excellent déshydratant. Selon la teneur en eau de cristallisation du sulfate de zinc, la déshydratation se fait en un temps qui varie de quelques minutes à quelques jours.

La réaction est limitée par la transformation de l'anhydrorétinol en réhydrorétinol ou isovitamine A_1.

L'acétate de vitamine A alcool se transforme également, quoique plus lentement que le rétinol en anhydrorétinol. La formation de l'anhydrorétinol à partir de l'acétate de rétinol est possible par action du sulfate de zinc sec, mais ne l'est pas avec le sulfate de zinc hydraté.

IIème PARTIE

ETUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL EN PRESENCE DE LIPIDES EXTRAITS DES FOIES

Dans la première partie de ce travail nous avons étudié la déshydratation de la vitamine A de synthèse soit sous la forme alcool, soit sous la forme ester (acétate) et nous avons constaté que le rétinol de synthèse se transforme très facilement en anhydrorétinol. A la suite de ces observations, nous avons recherché si la vitamine A contenue dans les milieux naturels, plus particulièrement dans les lipides extraits des foies, se déshydrate de façon analogue.

La deuxième partie est divisée en trois chapitres.

Le premier décrit le procédé de dosage de la vitamine A dans les huiles de foies d'animaux divers.

Dans le deuxième chapitre, nous exposons nos techniques de préparation des huiles, et après avoir constaté l'absence d'anhydrorétinol nos recherches en vue de déshydrater la vitamine A qui y est présente.

Puis nous mettons en présence le rétinol de synthèse, des lipides extraits de foies et des réactifs déshydratants pour étudier dans ces conditions la formation de l'anhydrorétinol et le comportement du rétinol. Les résultats obtenus sont développés dans le troisième chapitre.

IIème PARTIE

CHAPITRE I

DOSAGE ET SEPARATION DE LA VITAMINE A DANS LES MILIEUX NATURELS

Après avoir rappelé brièvement l'historique de la question et les principales méthodes de dosage de la vitamine A dans les huiles de foies, nous décrivons la technique personnelle utilisée au cours de ce travail.

Pour reprendre l'expression de MOORE, le dosage spectrophotométrique du rétinol fut un problème fort ardu "It may indicate however, the extreme complexity of a highly specialised field which has absorbed the energies of many skilled workers over a period of about 20 years". Dans ce domaine, il faut avant tout signaler les travaux importants de MORTON (57) dont les premières publications remontent à 1928; à cette époque, la vitamine A n'avait pas été isolée à l'état pur. C'est seulement en 1937 que le rétinol fut obtenu cristallisé à partir d'huiles concentrées de foies de poissons. Dès ce moment, la détermination du spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la vitamine A fut aisée et différents auteurs ont mis en évidence un maximum d'absorption à 328 mμ dans l'isopropanol. Nous savons actuellement que le maximum d'absorption se situe à 325 mμ E 1% / 1 cm = 1.750 dans l'isopropanol pour le rétinol pur, à 326 mμ pour l'acatate de rétinol et à 328 mμ pour les esters naturels du rétinol.

Les premières méthodes de dosage spectrophotométrique de la vitamine dans les huiles de poissons remontent à 1932. COWARD, DYER et MORTON (15) en comparant les méthodes physiques et les méthodes biologiques montrèrent l'avantage et la spécificité de la méthode spectrophotométrique. Quelque

temps après, en Angleterre "the Vitamin A sub-committee of the medical research council" faisait rentrer le dosage spectrophotométrique de la vitamine A parmi les méthodes officielles et établissait un coefficient de transformation entre E 1% / 1 cm. à 328 mμ et le nombre d'unités internationales par gramme : le coefficient de 1.600 fut adopté par la deuxième convention internationale sur la standardisation des vitamines. Le coefficient de transformation est actuellement porté à 1.900 pour les esters de rétinol et à 1.830 pour le rétinol libre.

1°/- Etude de la méthode spectrophotométrique -

Les premières techniques utilisées se contentaient d'une simple lecture au spectrophotomètre d'une huile en solution dans un solvant organique par rapport au solvant mis dans une cuve de référence. Dans les huiles riches en vitamine A, la forme de la courbe d'absorption présentait très peu de différence avec celle de la vitamine A pure, mais dans les huiles de faible teneur en A, la courbe, à part le maximum à 328 mμ s'écartait beaucoup du tracé théorique et même ne présentait pas de maximum. Il s'avérait très difficile de savoir quelle était dans l'absorption la part du fond spectral, et si dans les huiles riches le coefficient de transformation 1.600 pouvait être maintenu, il n'en était pas de même dans les huiles de faible concentration.

Les recherches s'orientèrent alors dans deux directions différentes.

Les premières essayèrent de déterminer quelle devait être la valeur réelle du facteur de conversion. Ces travaux, menés parallèlement par des auteurs anglais et américains entrainèrent une étude plus approfondie des mécanismes qui peuvent faire varier le titre en vitamine A des huiles de poissons: abaissement de l'activité biologique sous l'influence de l'oxygène, de la lumière (20), du solvant (80); mais les résultats positifs devaient venir d'un autre groupe de recherches.

D'autres chercheurs essayèrent plus spécialement d'éliminer les substances inactives avant d'établir le spectre de la vitamine A.

Un pas important dans ce domaine fut franchi en supprimant les glycérides par la saponification préalable de l'huile (46). D'autres techniques essayèrent de déterminer le spectre avant et après destruction de la vitamine A. Cette destruction fut tentée par irradiation U V ou par passage sur des terres absorbantes (4) mais les meilleurs résultats furent obtenus en faisant appel soit à des corrections graphiques, soit à des corrections chimiques.

A/- Emploi des corrections graphiques

L'utilisation des corrections graphiques fut préconisée en 1943 par VACHER (82) et en 1946 par MORTON et STUBBS (58 - 59).

Cette méthode consiste à choisir dans la courbe d'absorption de la vitamine A pure, 2 longueurs d'ondes situées de chaque côté du maximum telles que l'absorption soit égale (en principe 313 et 338,5 mμ) en opérant ensuite avec une huile en solution dans ce même solvant, la différence observée à ces deux maxima est due au fond spectral. MORTON (57) a établi un calcul pour la correction du sommet à 328 mμ.

La validité de ce procédé a été étudiée par de nombreux auteurs. Citons en particulier ADAMSON (1) qui, après contrôle des résultats par sept laboratoires différents, conclut que le calcul augmente la proportion de l'erreur qui peut atteindre ± 15 %.

B/- Corrections chimiques

La première technique sur l'isolement de la vitamine A par chromatographie fut publiée par BARUA et MORTON (6). Puis SERVIGNE (75) mit au point une méthode dont nous nous sommes inspirés pour doser la vitamine A dans les huiles de foies.

2°/- Méthode personnelle : Dosage spectrophotométrique de la vitamine A

La méthode que nous allons utiliser pour isoler la vitamine A des lipides extraits des foies est analogue à celle décrite précédemment pour doser soit le rétinol, soit l'acétate de rétinol en solution dans l'éther de pétrole.

Protocole expérimental -

Dans une colonne pour chromatographie de 8 mm de diamètre et de 400 mm de hauteur, nous plaçons 2 g. d'alumine MERCK (11), soit une hauteur de 3 cm. environ.

L'alumine est lavée par 10 ml d'éther de pétrole purifiée. Cette fraction est rejetée. Une quantité suffisante de lipides est ensuite dissoute dans l'éther de pétrole, telle que 1 ml de la solution finale renferme une concentration en vitamine A comprise entre 2 et 8 µg par ml., 5 ml de cette solution sont versés sur la colonne d'alumine, l'éluat est recueilli par fraction de 5 ml avec les précautions habituelles.

Les éluants successifs utilisés sont l'éther de pétrole, l'éther de pétrole renfermant 1 °/₀₀ de méthanol, l'éther de pétrole renfermant 1 % de méthanol.

Le spectre d'absorption des différentes fractions est déterminé après lecture au spectrophotomètre de BECKMANN.

Nous allons décrire comme exemple le dosage spectrophotométrique de la vitamine A contenue dans une huile de foie de morue pharmaceutique titrant 700 Unités Internationales par gramme.

Dosage de la vitamine A dans une huile de foie de morue pharmaceutique -

1 gramme d'huile de foie de morue est dissout dans 100 ml d'éther de pétrole, 5 ml de cette solution sont versés sur la colonne d'alumine, l'éluat est recueilli par fraction

de 5 ml. Les densités optiques de 300 mμ à 350 mμ des différentes fractions de la chromatographie sont données dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Densités optiques des fractions obtenues par chromatographie sur 2 g. d'alumine de 50 mg d'huile de foie de morue en solution dans l'éther de pétrole.

	Nos 1 - 2 Ether de pétrole	N° 3 EP 1 °/₀₀ méthanol	N° 4 EP 1 °/₀₀ méthanol	N° 5 EP 1 °/₀₀ méthanol	N° 6 EP 1 % méthanol
300 mμ	0	0,104	0,058	0	0,068
305 "	0	0,112	0,065	0	0,076
310 "	0	0,128	0,073	0	0,083
315 "	0	0,142	0,080	0	0,092
320 "	0	0,157	0,083	0,020	0,099
325 "	0	0,165	0,089	0,023	0,104
328 mμ	0	0,163	0,087	0,023	0,103
330 "	0	0,161	0,085	0,021	0,100
335 "	0	0,141	0,079	0,019	0,091
340 "	0	0,130	0,067	0,017	0,082
345 "	0	0,111	0,059	0,016	0,062
350 "	0	0,094	0,046	"	0,059

La somme des densités optiques à 325 mμ est de 0,381, elle correspond à la vitamine A contenue dans la prise d'essai en prenant la valeur de E 1% / 1 cm = 1.750, l'huile de foie de morue étudiée renferme 216 μg par gramme, soit 720 unités internationales de vitamine A.

IIème PARTIE

CHAPITRE 2

PREPARATION DES HUILES DE FOIES - DOSAGE DE LA VITAMINE A ET RECHERCHE DE L'ANHYDROVITAMINE A DANS LES HUILES DE FOIES - DESHYDRATATION DANS LES CONDITIONS UTILISEE 'IN VITRO" DE LA VITAMINE A CONTENUE DANS LES HUILES DE FOIES.

Nous allons tout d'abord exposer la technique utilisée pour extraire les lipides des foies des animaux étudiés.

I/- PREPARATION DES HUILES DE FOIES -

Les foies de différents poissons, morue (gadus morrhua), merlan (merlangus vulgaris), maquereau (scomber vulgaris) ou les foies provenant de poussins, rats ou lapins, sont prélevés dès que possible, un début d'autolyse faisant perdre aux graisses une partie de leur activité, par contre les foies peuvent être conservés dans du chloroforme pendant quelques jours à 0°.

Les foies sont broyés au mortier et déshydratés par le sulfate de sodium anhydre jusqu'à obtention d'un résidu pulvérulent.

Les lipides sont extraits à deux reprises par le chloroforme par agitation mécanique. Après filtration, le chloroforme est évaporé sous vide à une température de 30° environ.

Pendant la durée des expériences, les lipides ont été conservés au frigidaire.

II/- DOSAGE DE LA VITAMINE DANS LES HUILES DE FOIES

Nous avons observé des variations importantes de la teneur en vitamine A des lipides de foies suivant leur origine, variations d'ailleurs signalées par de nombreux auteurs. Cette constatation nous a amenés à doser systématiquement le rétinol dans les lipides étudiés.

La méthode a été décrite au chapitre précédent lors du dosage de la vitamine A dans l'huile de voie de morue pharmaceutique. 50 mg de lipides en solution dans 5 ml d'éther de pétrole sont chromatographiés sur alumine et la somme des densités optiques des fractions possédant le même spectre d'absorption exprimée soit en µg de rétinol, soit en unités internationales (Tableau VII bis).

TABLEAU VII bis

Vitamine A (exprimée µg et en U I par gramme) contenue dans les huiles de foies de différents animaux.

		Lapin	Rat	Poussin	Maquereau		Morue
					Printemps	Automne	
Vitamine A	µg/gramme	4.000	312	80	6.600	100	80
	UI/gramme	13.000	1.040	268	22.000	330	268

La teneur en vitamine A de ces lipides est extrêmement variable suivant l'animal d'une part, la saison d'autre part. Les lipides de foies de lapins renferment environ 10 fois plus de vitamine que ceux de foies de rats. Les foies de morues sont beaucoup moins riches en vitamine que les foies de maquereaux spécialement ceux prélevés au printemps.

III/- RECHERCHE DE L'ANHYDRORETINOL DANS LES LIPIDES EXTRAITS DES FOIES

L'anhydrorétinol a été très rarement signalé parmi les dérivés naturels de la vitamine A. EMBREE (19) l'isola par distillation moléculaire des huiles de morue et d'halibut; plus tard BARUA et MORTON (6), par chromatographie sur alumine de l'huile de baleine et élution du chromatogramme par l'éther de pétrole, montrèrent que les premières fractions contenaient de l'anhydrovitamine A en quantité extrêmement faible de l'ordre de 2 % de la quantité de vitamine A contenue dans ces graisses

A la suite de ces observations, nous avons recherché systématiquement si les lipides extraits de foies frais, ou les huiles de poissons conservées renferment de l'anhydrorétinol et s'il existe un rapport entre la teneur en vitamine A libre ou estérifiée de ces lipides et l'anhydrorétinol qui peut éventuellement y être présent.

A/- Recherche de l'anhydrorétinol dans les lipides immédiatement après leur extraction des foies

Protocole expérimental -

50 mg de lipides d'origine différente, dès leur extraction des foies frais, sont dissous dans 5 ml d'éther de pétrole et fractionnés par passage sur colonne d'alumine selon la technique exposée précédemment. Les absorptions des différentes fractions de l'éluat sont lues au spectrophotomètre sous 1 cm et la somme des densités optiques des fractions possédant le même spectre exprimées en µg par gramme de lipides. Les résultats du tableau VIII montrent les concentrations en anhydrorétinol, esters de rétinol et rétinol des lipides de foies de lapins, de rats et de poussins et parmi les lipides de foies de poissons ceux de maquereaux et de morues en indiquant pour ces poissons l'époque de l'année à laquelle les foies ont été prélevés, la teneur en vitamine A étant très variable suivant la saison.

TABLEAU VIII

Anhydrorétinol, esters de rétinol et rétinol, exprimés en µg par gramme des lipides de foies de lapins, rats, poussins, maquereaux et morues.

	Lapin	Rat	Poussin	Maquereau		Morue
Anhydrorétinol	35	0	0	14	0	0
Esters de rétinol	2.225	300	15	3.500	80	5
Rétinol	2.141	5	65	3.100	20	75

RESULTATS -

Quelle que soit la teneur en vitamine A, la quantité d'anhydrorétinol est extrêmement faible, toujours inférieure à 1 % de celle de la vitamine A présente dans ces graisses.

REMARQUE -

Le développement du chromatogramme montre que la proportion des esters par rapport au rétinol est très différente suivant l'animal.

CONCLUSION -

Dans les lipides de foies frais, la concentration en anhydrorétinol est insignifiante. Ce dérivé semble n'être qu'un produit de transformation ou de dégradation de la vitamine A et non pas une substance naturelle, en cela nos observations coïncident avec celles des auteurs précédemment cités.

B/- Recherche de l'anhydrorétinol dans les huiles de foies de poissons conservées

Nous avons ensuite examiné des huiles de poissons conservées, en particulier différents échantillons d'huile de foie de morue pharmaceutique et un échantillon d'huile de thon provenant de Norvège, extrêmement riche en vitamine A.

Ces huiles en solution dans l'éther de pétrole sont fractionnées par passage sur colonne d'alumine, dans les mêmes conditions que précédemment; les résultats du tableau IX expriment l'anhydrorétinol, les esters de rétinol, et le rétinol en µg par gramme de lipides.

TABLEAU IX

Anhydrorétinol, esters de rétinol, rétinol, exprimés en µg /g de lipides de foies de poissons conservés.

	Huile de foie de morue			Huile de thon
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	
Anhydrorétinol	1	0	8	105
Esters de rétinol	240	210	380	4.830
Rétinol	105	180	160	3.720

RESULTATS -

Les huiles de poissons conservées renferment seulement des traces d'anhydrorétinol directement en rapport avec la teneur en vitamine A de ces huiles.

CONCLUSION -

Les lipides extraits de foies de différents animaux, examinés dès leur extraction, quelle que soit leur teneur en vitamine A alcool ou estérifiée, ne renferment que des traces insignifiantes d'anhydrorétinol.

Les huiles de foies de poissons conservées, peu riches en vitamine A ne contiennent pas d'anhydrorétinol, par contre, certains échantillons d'huile de thon, très riches en vitamine, en renferment de faibles quantités.

Etant donné l'instabilité "in vitro" de la vitamine A et sa remarquable conservation dans les lipides naturels, nous nous sommes alors proposé de rechercher si la vitamine A pouvait se déshydrater dans ces huiles aussi facilement qu'"in vitro".

III/- DESHYDRATATION DE LA VITAMINE A CONTENUE DANS LES LIPIDES EXTRAITS DE FOIES

Nous avons utilisé des huiles de foies de lapins en raison de leur teneur élevée en vitamine A et nous avons essayé de déshydrater cette vitamine A naturelle, en faisant appel aux réactifs utilisés au cours de la première partie, à savoir l'éthanol acide, ou le sulfate de zinc.

Pour ralentir la formation d'anhydrorétinol et rendre plus aisées les lectures, nous avons utilisé soit des solutions acides très faibles, soit le sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé.

Protocole expérimental -

1/- Déshydratation par l'éthanol chlorhydrique -

Dans un premier flacon jaugé de 50 ml nous ajoutons successivement :

- 4 ml de la solution de rétinol synthétique (100 µg/ml)
- 0,75 ml d'éthanol 0,033 N en H Cl
- q s. 50 ml d'éther de pétrole

cette solution renferme 8 µg /ml de rétinol et son acidité est 0,0005 N en H Cl; elle nous servira de témoin.

Les lectures des densités optiques sont faites régulièrement pendant les huit premières heures.

Dans un deuxième flacon jaugé de 50 ml. nous ajoutons successivement :

- une quantité déterminée de lipides telle que leur teneur en vitamine soit très voisine de celle de la solution de vitamine A synthétique, soit 8 µg /ml.
- 0,75 ml d'éthanol 0,033 N en H Cl
- q s. 50 ml d'éther de pétrole.

De même les lectures des densités optiques sont faites régulièrement pendant les huit premières heures.

2/- Déshydratation par le sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé

Dans un premier flacon jaugé de 50 ml. nous ajoutons successivement :

- 4 ml de la solution de rétinol A (100 µg /ml)
- 50 ml d'éther de pétrole
- 1 g. de sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé.

Cette solution renferme 8 µg /ml. de rétinol.

Dans un deuxième flacon jaugé de 50 ml. nous plaçons :

- une quantité déterminée de lipides telle que leur teneur en vitamine A soit très voisine de 8 µg /ml
- q s. 50 ml. d'éther de pétrole,
- 1 gr. de sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé.

Nous procédons chaque jour à la chromatographie sur alumine BROCKMANN de 5 ml. de la solution précédente et nous suivons les modifications du spectre d'absorption des premières fractions d'élution du chromatogramme par l'éther de pétrole au spectrophotomètre.

1°/- Déshydratation de la vitamine A contenue dans les lipides extraits de foies de lapins par l'éthanol chlorhydrique 0,0005 N en H Cl

Le tableau (X) montre l'évolution de la densité optique lue à 390 mμ de 30 minutes à 8 heures, de la première solution renfermant 8 μg/ml de rétinol de synthèse et de la deuxième solution renfermant 2 mg/ml de lipides extraits de foies de lapins. La concentration de 2 mg fut choisie en raison de la teneur en vitamine A des lipides étudiés qui renferment environ 4 μg /ml de vitamine A, soit sous forme d'alcool, soit sous forme estérifiée comme nous l'avons montré précédemment.

TABLEAU X

DESHYDRATATION PAR L'ETHANOL ACIDE 0,0005 N EN H Cl DE LA VITAMINE CONTENUE DANS 200 mg. DE LIPIDES EXTRAITS DE FOIES DE LAPINS EN SOLUTION DANS 100 ml. D'ETHER DE PETROLE

Lecture de la Densité optique à 390 mμ.

	TEMPS EN MINUTES	30	60	120	240	480
Do à 390 mμ	2 mg/ml de lipides	0,017	0,017	0,020	0,019	0,017
	8 μg /ml de rétinol synthétique	0,053	0,100	0,209	0,387	0,642

L'examen du tableau (X) nous montre que la densité optique à 390 mμ de la solution renfermant les lipides extraits des foies de lapins ne varie pas; donc, la vitamine A naturelle en présence des lipides extraits des foies ne se déshydrate pas, par action de l'éthanol chlorhydrique, comme le fait le rétinol de synthèse.

2°/- Déshydratation de la vitamine A contenue dans les lipides extraits de foies de lapins par le sulfate de zinc

Le tableau (XI) montre l'évolution de la densité optique lue à 390 mμ après chromatographie sur alumine de 5 ml de la solution d'éther de pétrole renfermant par ml, soit 8 μg de rétinol, soit 2 mg. de lipides extraits des foies de lapins en présence de 2 % de sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé.

TABLEAU XI

DESHYDRATATION PAR LE SULFATE DE ZINC 7 OH^2 PULVERISE A LA CONCENTRATION DE 2 % DE LA VITAMINE A CONTENUE DANS 200 mg DE LIPIDES DE FOIES DE LAPINS EN SOLUTION DANS 100 ml D'ETHER DE PETROLE

	JOURS	1	2	3	4	5	6
Do à 390 mμ	2 mg/ml de lipides	0,020	0,020	0,019	0,021	0,020	0,017
	8 μg/ml de rétinol synthétique	0,148	0,227	0,257	0,337	0,381	0,435

Résultats -

Le sulfate de zinc ne déshydrate pas la vitamine A naturelle contenue dans les lipides extraits des foies.

Discussion -

Les lipides extraits des foies frais ne renferment pas d'anhydrorétinol, seules les huiles de foies conservés , très riches en vitamine A, peuvent en contenir des quantités insignifiantes.

La vitamine A naturelle, sous la forme alcool ou estérifiée dans les lipides de foies ne se déshydrate ni par l'action de l'éthanol chlorhydrique ni du sulfate de zinc.

A l'instabilité de la vitamine dans différents solvants s'oppose sa stabilité dans les lipides naturels, ce qui explique probablement l'absence d'anhydrorétinol constatée dans les huiles de foies.

Ces résultats conduisent naturellement à supposer qu'il existe dans les lipides extraits de foies des substances qui inhibent la déshydratation de la vitamine A.

En vue de vérifier cette hypothèse nous nous sommes adressés au rétinol de synthèse étant donné sa très grande facilité à se déshydrater "in vitro" et nous avons étudié la formation d'anhydrorétinol à partir du rétinol de synthèse en présence de lipides extraits des foies de différents animaux qui accompagnent la vitamine A naturelle.

IIème PARTIE

CHAPITRE 3

ETUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL SYNTHETIQUE EN PRESENCE DE LIPIDES DE FOIES

Dans ce chapitre nous avons étudié la déshydratation du rétinol de synthèse en présence de lipides de foies. Avec les mêmes conditions expérimentales que celles précisées au cours de la 1ère partie nous nous sommes efforcés, dans un premier temps, d'étudier la formation de l'anhydrorétinol en présence de lipides, et dans un deuxième temps d'étudier le comportement du rétinol avec ces mêmes lipides.

I/- ETUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL EN PRESENCE DE DIFFERENTS LIPIDES

A/- HUILES EXTRAITES DE FOIES FRAIS

1) Déshydratation par $SO^4 Zn, 7 OH^2$ (concentration 2%)

Protocole expérimental -

Dans un flacon jaugé de 50 ml. on mesure successivement 4 ml. de la solution de rétinol et de tocophérol (100 µg /ml), une certaine quantité de lipides extraits de foies - en général de 20 à 200 mg. - on complète à 50 ml. avec l'éther de pétrole puis on ajoute 1 gramme de sulfate de zinc $7 OH^2$ pulvérisé.

Cette solution renferme 8 µg par ml de rétinol synthétique.

On procède chaque jour à la chromatographie sur alumine BROCKMANN de 5 ml de la solution précédente et on suit les modifications du spectre d'absorption des premières fractions d'élution du chromatogramme par l'éther de pétrole au spectrophotomètre.

Les expériences sont prolongées pendant 15 jours.

1°) Foies de maquereaux

Les foies sont peu volumineux (0,5 à 1 % du poids du poisson). Ils renferment environ 6,5 à 8,5 % de lipides.

Ces lipides sont utilisés à des concentrations allant de 40 à 400 mg dans 100 ml. d'éther de pétrole renfermant 800 µg de rétinol, du tocophérol et 2 grammes de sulfate de zinc cristallisé pulvérisé. Le tableau (XII) montre l'évolution des densités optiques du 1er au 15ème jour lues à 390 mµ après chromatographie.

TABLEAU XII

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mµ EN PRESENCE DE QUANTITES CROISSANTES D'HUILE DE MAQUEREAUX

Lipides en mg dans 100 ml de solution	TEMPS EN JOURS						
	1	2	3	4	5	9	15
0	0,130	0,172	0,227	0,280	0,342	0,607	0,627
40 mg	0,077	0,168	0,343	0,419	0,482	0,745	1,025
200 mg	0,041	0,105	0,172	0,195	0,210	0,267	0,356
300 mg	0,010	0,019	0,025	0,036	0,040	0,064	0,100
400 mg	0	0	0	0	0		0

En présence de 40 mg de lipides la formation d'anhydrorétinol est ralentie le premier jour, puis se poursuit régulièrement jusqu'au 15ème jour. Rappelons qu'en l'absence de lipides la deshydratation s'arrêtait dès le 9ème jour pour des raisons déjà précisées dans la première partie de ce travail.

200 mg % ralentissent mais n'empêchent pas la formation régulière d'anhydrorétinol, 300 mg inhibent presque totalement la déshydratation du rétinol de synthèse pendant 15 jours et 400 mg l'inhibent totalement.

2°) Foies de merlans

Les foies sont très volumineux. Ils représentent environ 3 à 5 % du poids du poisson. Ils renferment jusqu'à 25 % de lipides.

Le tableau (XIII) représente l'anhydrorétinol formé exprimé en densités optiques à partir d'une solution renfermant 8 µg/ml de rétinol et des quantités croissantes de lipides de foies de merlans en présence de 2 % de sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé.

TABLEAU XIII

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mµ EN PRESENCE DE QUANTITES CROISSANTES D'HUILE DE MERLANS

Lipides en mg pour 100 ml	TEMPS EN JOURS						
	1	2	3	4	5	9	15
0	0,130	0,172	0,227	0,280	0,342	0,607	0,627
40 mg	0,041	0,082	0,100	0,139	0,142	0,255	0,09[illegible]
200 mg	0,011	0,045	0,082	0,105	0,110	0,157	0,26[illegible]
300 mg	0,010	0,010	0,017	0,030	0,044	0,050	0,08[illegible]
400 mg	0	0	0	0	0	0	0

Avec 400 mg % de lipides, la formation d'anhydrorétinol

nol se poursuit régulièrement pendant 15 jours, 200 mg diminuent la quantité d'anhydrorétinol formé , 300 mg % inhibent presque totalement la déshydratation du rétinol.

Les huiles de merlans sont plus actives que les huiles de maquereaux puisqu'en présence de 200 mg % il se forme moins d'anhydrorétinol.

3°) Foies de morues

Les foies sont très volumineux, leur poids représente environ 5 % de celui du poisson, on peut en extraire 25 % de lipides.

En raison de la grande activité antidéshydratante de ces lipides, nous avons été amenés à utiliser des concentrations plus faibles que celles envisagées auparavant. Dans les expériences suivantes, la concentration des lipides de foies de morues varie de 4 mg à 200 mg pour 100 ml d'éther de pétrole renfermant toujours 800 µg de rétinol, du tocophérol et 2 gr. de sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé.

Les résultats sont portés sur le tableau XIV.

.../...

TABLEAU XIV

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mμ EN PRESENCE DE QUANTITES CROISSANTES D'HUILE DE FOIES DE MORUES

Lipides en mg pour 100 ml.	TEMPS EN JOURS						
	1	2	3	4	5	9	15
0	0,130	0,172	0,227	0,280	0,342	0,607	0,627
4 mg	0,107	0,200	0,275	0,321	0,380	0,630	0,980
20 mg	0,068	0,105	0,142	0,171	0,185	0,297	0,340
40 mg	0,042	0,078	0,099	0,125	0,146	0,210	0,280
100 mg	0	0,020	0,027	0,035	0,040	0,061	0,100
200 mg	0	0	0	0	0	0,025	0,041

Le tableau XIV montre que 4 mg % de lipides ne protègent pas le rétinol mais que 20 mg % diminuent de moitié la quantité d'anhydrorétinol formé, 200 mg% inhibent totalement la déshydratation du rétinol.

L'activité des lipides provenant des foies de morues est bien supérieure à celle des huiles de poissons déjà citées.

Après avoir étudié les huiles extraites de foies de poissons toutes actives à des degrés divers, nous avons examiné l'action antidéshydratante de lipides provenant de foies de rats et de poussins.

4°) Foies de poussins

Les foies sont prélevés dès la mort de l'animal sur des animaux âgés d'environ 10 jours. Ils sont peu développés, leur poids représente environ 1 % de celui de l'animal, ils renferment 3 % de lipides.

La tableau XV résume l'évolution des densités optiques lues à 390 mμ d'une solution de rétinol 8 μg/ml dans l'éther de pétrole renfermant des quantités croissantes d'huiles extraites de foies de poussins en présence de 2 % de SO_4 Zn 7 OH_2 pulvérisé.

TABLEAU XV

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mμ EN PRESENCE DE QUANTITES CROISSANTES D'HUILE DE FOIES DE POUSSINS

Lipides en mg pour 100 ml.	TEMPS EN JOURS						
	1	2	3	4	5	9	15
0	0,130	0,172	0,227	0,280	0,342	0,607	0,627
4 mg	0,089	0,140	0,200	0,280	0,320	0,569	1,030
20 mg	0,035	0,060	0,070	0,075	0,100	0,112	0,870
40 mg	0	0,029	0,029	0,030	0,031	0,034	0,037
100 mg	0	0	0	0	0	0	0

Résultats -

4 mg % de lipides retardent la formation d'anhydrorétinol pendant 2 jours, puis la concentration s'élève régulièrement pour atteindre le 15ème jour un chiffre bien supérieur à celui observé en l'absence de lipides.

40 mg % inhibent totalement la déshydratation du rétinol pendant 15 jours.

Ces résultats montrent que l'action antidéshydratante de ces lipides est supérieure à celle des huiles de foies de poissons étudiées.

5°) Foies de rats

Les foies sont prélevés sur de jeunes rats dont le poids varie de 150 à 200 grammes.

Les foies ont une concentration en lipides très voisine de celle des foies de poussins, ils renferment entre 2 et 3 % de lipides.

Le tableau XVI résume l'évolution des densités optiques lues à 390 mμ d'une solution de rétinol 8 μg/ml dans l'éther de pétrole renfermant des quantités croissantes d'huiles extraites de foies de rats en présence de 2 % de SO_4 Zn 7 OH_2 pulvérisé.

TABLEAU XVI

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do à 390 mμ EN PRESENCE DE QUANTITES CROISSANTES D'HUILES DE FOIES DE RATS.

Lipides en mg pour 100 ml.	TEMPS EN JOURS						
	1	2	3	4	5	9	15
0	0,130	0,172	0,227	0,280	0,342	0,607	0,627
4 mg	0,033	0,053	0,060	0,075	0,087	0,112	0,124
20 mg	0,009	0,015	0,020	0,021	0,023	0,045	0,063
40 mg	0	0	0	0	0	0	0

Résultats -

Nous sommes immédiatement frappés après l'examen du tableau (XVI) de l'activité considérable de ces huiles. 4 mg % protègent presque totalement le rétinol de la déshydratation et 20 mg % inhibent sa transformation en anhydrorétinol.

Les lipides extraits des foies de rats montrent une activité très supérieure à celle des autres lipides précédemment étudiés.

A des degrés divers les lipides de foies ralentissent et inhibent la déshydratation du rétinol de synthèse par le sulfate de zinc.

En présence de faibles concentrations de ces lipides la formation de l'anhydrorétinol est régulière et se poursuit jusqu'à la fin de l'expérience.

Le pouvoir protecteur de ces lipides persiste-t-il si le déshydratant est l'éthanol chlorhydrique ?

2) Déshydratation par l'éthanol chlorhydrique 0,0005 N

Nous utilisons pour déshydrater le rétinol synthétique en présence de lipides la même concentration en acide chlorhydrique que lors de la déshydratation de la vitamine A naturelle présente dans les lipides extraits des foies, c'est-à-dire des solutions 0,0005 N en H Cl.

Protocole expérimental -

Dans un flacon jaugé de 50 ml nous plaçons successivement :

- 4 ml. de la solution de rétinol et de tocophérol dans l'éther de pétrole renfermant 100 µg/ml.
- 0,75 ml d'éthanol 0,033 N en H Cl
- des quantités croissantes de lipides allant de 4 mg à 200 mg
- q s. 50 ml d'éther de pétrole.

Cette solution renferme 8 µg/ml de rétinol.

La formation d'anhydrorétinol fut suivie par la lecture des densités optiques à 390 mµ après 1 h., 2 h., 24 h. de ces différentes solutions.

L'activité déshydratante de l'éthanol chlorhydrique 0,0005 N en H Cl étant plus intense que celle du sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé, nous utilisons les lipides les plus ac-

tifs, à savoir : ceux de morues, de poussins et de rats pour que l'action déshydratante éventuelle reste évidente.

Résultats -

Le tableau XVII représente les concentrations pour 100 ml exprimées en µg d'anhydrorétinol formé par action de l'éthanol chlorhydrique 0,0005 N sur une solution renfermant 800 µg % de rétinol en présence de lipides extraits de foies de morues, de poussins et de rats.

TABLEAU XVII

ANHYDRORETINOL FORME EN µg/100 ml A PARTIR DE 800 µg DE RETINOL DANS UNE SOLUTION ETHANOLIQUE 0,0005 N EN H Cl EN PRESENCE DE LIPIDES DE FOIES EN mg/100 ml.

	Témoin	Morue				Poussin				Rat			
	0	4mg	20mg	40mg	200mg	4 mg	20 mg	40mg	200 mg	4mg	20mg	40mg	200 mg
1h	31	44	42	40	40	40	8	0	0	31	9	0	-
2h	66	88	85	81	81	78	20	6	0	66	18	5	-
24h	338	212	180	146	115	370	170	34	0	345	105	30	-

1°/- Les lipides extraits des foies de morues, utilisés à des concentrations variant de 4 à 200 mg pour 100 ml n'inhibent pas la déshydratation du rétinol synthétique pendant les deux premières heures et dans tous les cas la concentration très voisine en anhydrorétinol est supérieure à celle du témoin sans lipides. Mais après 24 h. il s'est formé des concentrations allant de 115 à 212 µg en présence de lipides de foies de morues tandis que la solution sans lipides en renferme 338 µg.

Ces lipides aux concentrations utilisées ralentissent la déshydratation du rétinol mais ne sont pas suffisamment actifs pour l'inhiber.

2°/- Il faut 20 mg de lipides de foies de poussins pour protéger le rétinol pendant les deux premières heures, et 40 mg pour que l'inhibition de la déshydratation se poursuive 24 h.

3°/- Les lipides de foies de rats ont une action très voisine, mais plus forte que celle des lipides de poussins.

Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus par action du sulfate de zinc, nous constatons une action protectrice identique, plus ou moins intense suivant l'origine des lipides.

DISCUSSION -

Quelles conclusions pouvons-nous tirer de ces premières expériences ?

1 - Tout d'abord il existe dans les lipides extraits des foies de différents animaux une substance qui inhibe ou retarde la déshydratation du rétinol de synthèse.

2 - L'activité des lipides est très variable suivant leur origine. Pour résumer nos observations, nous avons groupé dans le tableau (XVIII) les quantités respectives d'anhydrorétinol formé en présence des différents lipides.

.../...

TABLEAU XVIII

QUANTITE D'ANHYDROVITAMINE A_1 (µg) PRODUITE PAR $SO_4Zn\ 7\ OH_2$ EN PRESENCE DE LIPIDES EXTRAITS DE FOIES (en mg) POUR 100 ml DE SOLUTION RENFERMANT 800 µg DE VITAMINE A_1 ALCOOL

Jours	0 lipides	Rat		Poussin		Morue		Merlan		Maquereau	
		4mg	20mg	4 mg	40mg	4 mg	200mg	40mg	300mg	40 mg	300mg
1	46	10	3	18,8	0	33,6	0	12,2	0	47,1	0
2	71	17	4,7	38,9	2,8	58,1	3,1	30,8	2,8	65,1	2,2
3	80	19	6,2	62,8	4,7	86,4	6,2	39,3	3,1	107,8	3,1
4	106	23	6,2	83,3	8,4	108,4	11,5	44,6	3,7	138,3	4,2
5	112	27	6,3	102,2	9,4	134,5	13,5	56,6	4,7	176,1	6,5
15	200	40	21	324	12	310	15,7	305	26	322	30

L'inhibition de la déshydratation par le sulfate de zinc de 800 µg de rétinol de synthèse en solution dans 100 ml. d'éther de pétrole peut être réalisée soit par 20 mg de lipides de foies de rats, 40 mg de lipides de foies de poussins, 200 mg de lipides de foies de morues, 300 mg de lipides de foies de merlans ou de maquereaux, tout en remarquant que les lipides de cette dernière origine sont les moins actifs.

3 - Si nous comparons les résultats obtenus dans les témoins sans lipides à ceux des expériences nous constatons qu'en présence de lipides de différentes origines utilisés à des concentrations trop faibles pour inhiber complètement la déshydratation du rétinol il se forme souvent après 15 jours des taux d'anhydrorétinol supérieurs aux 200 µg trouvés dans les témoins sans lipides.

Il nous faut expliquer pourquoi en présence de lipides il se forme plus d'anhydrorétinol qu'en leur absence. Nous avons montré au cours de la première partie de ce travail qu'une fraction importante de rétinol se détruit sous l'action des déshydratants. Les lipides n'exercent-ils pas également une action protectrice sur la destruction du rétinol par les déshydratants.

4 - L'action inhibitrice des lipides de foies sur la déshydratation du rétinol conduit à rechercher si cette propriété est stable dans les huiles de foies ou dans les foies lors de leur conservation.

5 - Est-ce la présence de lipides qui inhibe la déshydratation du rétinol ou existe-t-il dans les lipides de foies un facteur spécifique protégeant électivement le rétinol de la déshydratation ?

Nous allons essayer d'étudier successivement ces différentes questions.

B/- HUILES CONSERVEES

Dans le but d'étudier la fragilité de la substance responsable de l'activité antidéshydratante et son éventuelle stabilité dans les lipides ou au cours de la putréfaction des foies, nos essais ont porté sur des huiles de foies de poissons conservées telles que l'huile de foie de morue pharmaceutique ou sur des lipides extraits de foies conservés.

1°/- Huile de foie de morue pharmaceutique

Nous avons reconduit le même protocole expérimental et utilisé l'huile de foie de morue pharmaceutique à deux concentrations 400 mg ou 4 grammes dans une solution renfermant 800 µg pour 100 ml. de rétinol dans l'éther de pétrole en présence de sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé.

L'activité protectrice sur le rétinol est très variable suivant les échantillons. Nous donnons dans le tableau (XIX) les résultats obtenus avec une huile considérée comme moyenne.

TABLEAU XIX

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mμ EN PRESENCE DE 400 mg ET DE 4 GRAMMES D'HUILE DE FOIE DE MORUE PHARMACEUTIQUE

	JOURS						
	1	2	3	4	5	9	15
Lipides en mg 0	0,118	0,225	0,347	0,478	0,548	0,607	0,640
400 mg	0,068	0,134	0,204	0,270	0,334	0,639	1,315
4 gr	0,015	0,020	0,027	0,030	0,044	0,140	0,368

400 mg % d'huile de foie de morue ralentissent la formation d'anhydrorétinol pendant les 5 premiers jours, puis la concentration s'élève régulièrement pour atteindre finalement un chiffre bien supérieur à celui observé dans le témoin sans lipides.

4 gr % inhibent fortement la déshydratation pendant 5 jours; l'activité se ralentit entre le 9ème et le 15ème jour. A la fin de l'expérience la concentration en anhydrorétinol est le tiers de celle obtenue avec 400 mg.

L'activité antidéshydratante de 4 g. d'huile de foie de morue pharmaceutique est bien inférieure à celle de 200 mg de lipides de foies frais. Cette constatation met en évidence la fragilité de la substance responsable de l'action inhibitrice du rétinol.

2°/- Huiles extraites de foies de morues conservés

Des foies de morues ont été conservés dans le chloroforme pendant 30 jours à 0°. Nous avons ensuite extrait les lipides par les procédés habituels et essayé dans les mêmes conditions.

Le tableau (XX) montre l'anhydrovitamine A, formée à partir d'une solution de rétinol renfermant 800 µg dans 100 ml en présence de 40 mg et 400 mg de lipides extraits de foies conservés dans le chloroforme comparativement aux lipides extraits directement des foies frais.

TABLEAU XX

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do à 390 mµ EN PRESENCE DE LIPIDES EXTRAITS DE FOIES DE MORUE CONSERVES DANS LE CHLOROFORME PENDANT 30 JOURS

	TEMPS EN JOURS					
	Lipides en mg	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours
Témoin	0	0,130	0,172	0,227	0,280	0,342
Foies conservés	40 mg	0,140	0,181	0,232	0,292	0,351
	400 mg	0,010	0,015	0,020	0,025	0,027
Foies frais	40 mg	0,042	0,078	0,099	0,125	0,146
	200 mg	0	0	0	0	0

40 mg de lipides extraits de foies conservés sont sans action sur la déshydratation du rétinol et il faut utiliser 400 mg pour inhiber la formation d'anhydrorétinol pendant 5 jours.

Ces expériences mettent en évidence la fragilité de la substance responsable de l'action antidéshydratante et sa mauvaise conservation, soit dans les foies eux-mêmes, soit dans les huiles de foies.

C/- HUILES VEGETALES - GLYCERIDES SYNTHETIQUES

Afin de rechercher si le pouvoir inhibiteur de la déshydratation du rétinol constatée chez les lipides de foies leur est spécifique, nous avons étudié la formation de l'anhydrorétinol dans les mêmes conditions mais en présence d'un lipide végétal (huile d'olive neutralisée) et un lipide synthétique, la trioléine, utilisés à deux concentrations 400 mg et 4 g.

Les résultats montrent dans le tableau (XXI), comme précédemment, l'évolution de la densité optique à 390 mμ d'une solution renfermant 8 μg/ml de rétinol en présence de ces deux catégories de lipides.

TABLEAU XXI

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mμ EN PRESENCE D'HUILE D'OLIVE ET DE TRIOLEINE

		TEMPS EN JOURS						
		1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	9 jours	15 jours
sans lipides		0,130	0,172	0,227	0,280	0,342	0,607	0,627
Lipides en mg Huile d'olive neutralisée	400 mg	0,090	0,152	0,189	0,261	0,325	0,618	0,638
	4 gr	0,060	0,092	0,157	0,220	0,250	0,480	0,580
Trioléine	400 mg	0,082	0,152	0,190	0,276	0,362	0,592	0,627
	4 gr	0,087	0,115	0,167	0,215	0,270	0,501	0,634

L'huile d'olive neutralisée et la trioléine n'exercent aucune action sur la déshydratation du rétinol de synthèse, après une journée les lipides semblent freiner un peu la réaction, mais dès le 2ème jour la formation d'anhydrorétinol se déroule identiquement dans les expériences et le témoin.

CONCLUSION -

Les lipides extraits des foies de rats, poussins, morues, merlans, maquereaux exercent une action retardatrice et à doss suffisante inhibitrice sur la déshydratation "in vitro" du rétinol de synthèse.

Cette propriété semble être spécifique des lipides d'origine animale puisque ni l'huile d'olive, ni la trioléine n'exercent cette action.

La substance responsable de l'action antidéshydratante se montre fragile, elle disparait plus ou moins rapidement au cours de la conservation des foies ou des huiles de foies.

II/- ETUDE DE LA STABILITE DU RETINOL EN PRESENCE DE SULFATE DE ZINC ET DE LIPIDES

Deux points importants sont à souligner :

- le rétinol de synthèse en présence de déshydratants ne se transforme que partiellement en anhydrorétinol, une fraction importante est détruite

- lorsque la solution renferme des lipides de foies à des concentrations trop faibles pour inhiber la déshydratation, l'anhydrorétinol formé est supérieur à celui trouvé en l'absence de lipides.

Ces faits nous conduisent à comparer le sort du rétinol en présence et en l'absence de lipides en prenant comme exemple un lipide extrait de foies de rats et l'huile d'olive.

Protocole expérimental

Nous reprenons le procole expérimental décrit dans la 1ère partie.

A la solution de rétinol et de tocophérol dans l'éther de pétrole renfermant 100 µg/ml. nous ajoutons une concentration de lipides de foie choisis en fonction des expériences précédentes, de manière à retarder sans inhiber la déshydratation du rétinol soit 2 mg/ml, ou un lipide végétal, théoriquement inactif, l'huile d'olive neutralisée, en présence comme déshydratant du sulfate de zinc sous deux formes, soit le sel cristallisé pulvérisé, soit le sel desséché à la concentration de 2 %.

Nous procédons chaque jour, pendant 30 jours, à la chromatographie de 1 ml. de cette solution diluée au 1/5, 1 ml correspondant à 20 µg de rétinol et à 0,4 mg de lipides extraits de foies de rats ou 0,4 mg d'huile d'olive.

Résultats -

Le tableau (XXII) montre d'une part la disparition du rétinol dont la concentration est calculée en fonction de l'absorption à 325 mµ E 1% / 1 cm = 1.750, d'autre part la formation de l'anhydrorétinol dont la concentration est calculée d'après la valeur de E 1% / 1 cm = 3.180 à 390 mµ d'une solution renfermant 100 µg/ml de rétinol, 2 mg/ml d'huile d'olive ou de lipides extraits des foies et 2 % de sulfate de zinc 7 OH_2 pulvérisé ou desséché.

TABLEAU XXII

DESHYDRATATION PAR SO^4 Zn DESHYDRATE OU SO^4 Zn PULVERISE A LA CONCENTRATION 2 %

1/- Disparition du rétinol exprimé en µg par ml.

2/- Formation d'anhydrorétinol en µg par ml. à partir d'une solution renfermant 100 µg/ml de rétinol et 2 mg/ml de lipides, soit végétaux (huile d'olive), soit animaux (foies de rats)

			Temps en jours					
			0	1	5	15	20	30
SO^4 Zn pulvérisé	0 Lipides	Rétinol	100	80	23	5,5	0	0
		Anhydrorétinol	0	4	15	17,5	16	10
	Huile d'olive 2 mg/ml	Rétinol	100	80	23	5,5	0	0
		Anhydrorétinol	0	4	15	17,5	16	10
	Lipides de rats 2 mg/ml	Rétinol	103,5	100	99	98,7	98,4	98
		Anhydrorétinol	0	2,5	3	5	5,3	5,5
SO^4 Zn déshydraté.	0 Lipides	Rétinol	100	35	10	0	0	0
		Anhydrorétinol	0	8	20	19	13	8
	Huile d'olive 2 mg/ml	Rétinol	100	35	10	0	0	0
		Anhydrorétinol	0	8	20	19	13	8
	Lipides de rats 2 mg/ml	Rétinol	103,5	70	69	56,5	55	55
		Anhydrorétinol	0	10	11,5	13	13,5	19

Résultats -

L'examen du tableau XXII montre de façon très significative pourquoi, dans certains cas, en présence de lipides la formation d'anhydrorétinol est plus lente, plus régulière et peut at-

teindre des taux plus élevés, l'action anti-déshydratante s'accompagnant d'une action protectrice générale du rétinol. Précisons ces observations.

1°/- Action du SO^4 Zn 7 OH^2 pulvérisé

Le premier jour la concentration calculée en rétinol est de 103,5 µg/ml. Cet excédent est dû à l'apport de vitamine A naturelle par les lipides extraits de foies de rats, puis le rétinol décroit très lentement et le 30ème jour il persiste encore 98 µg/ml; ce même jour la concentration en anhydrorétinol est de 5,6 µg/ml. Le rétinol ne s'est pas détruit, il s'est transformé régulièrement en anhydrorétinol.

2°/- Action du sulfate de zinc desséché

Entre le début de l'expérience et le premier jour, la baisse brutale de la concentration en rétinol ne correspond pas à l'anhydrorétinol formé, la destruction du rétinol est de l'ordre de 20 %. La concentration en lipides trop faible par rapport à l'activité du déshydratant entraine une disparition quasi immédiate du rétinol, la fraction restante persiste dans la solution et se déshydrate lentement.

Nous constatons que l'huile d'olive aux mêmes concentrations se montre inefficace pour inhiber la destruction du rétinol en présence de sulfate de zinc.

En conclusion, même lorsque la concentration des lipides extraits des foies est trop faible pour inhiber la déshydratation du rétinol, ilsse montrent néanmoins efficaces pour empêcher sa destruction par les deshydratants. Cette propriété peut expliquer la stabilité de la vitamine A dans les préparations de foies et plus particulièrement dans les huiles de foies officinales.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE -

1/- Les lipides extraits des foies ne renferment pas d'anhydrorétinol.

2/- La vitamine A présente dans les huiles de foies ne se transforme pas en anhydrorétinol ni par action du sulfate de zinc, ni par l'éthanol chlorhydrique.

3/- Ces faits nous ont conduits à mettre en évidence dans les lipides extraits des foies, la propriété d'inhiber ou de retarder la déshydratation du rétinol de synthèse. Le degré d'activité des lipides est différent suivant leur origine mais ils protègent tous le rétinol.

Si dans les milieux naturels la stabilité de la vitamine A vis-à-vis de l'oxygène a pu être expliquée par la présence de substances anti-oxydantes (tocophérols) DAVIES et MOORE (16), c'est à d'autres facteurs qu'il faut attribuer l'action anti-déshydratante que nous venons de mettre en évidence puisque le tocophérol est ajouté sans succès dans les milieux réactionnels; il n'inhibe pas "in vitro" la déshydratation du rétinol.

4/- La substance éventuellement responsable de l'action anti-déshydratante se montre fragile puisqu'elle se détruit au cours de la conservation, soit des lipides, soit des foies.

5/- Le rôle des huiles de foies ne se limite pas à cette action anti-déshydratante; elles protègent le rétinol de synthèse d'une destruction plus ou moins rapide en présence de déshydratants.

6/- L'action inhibitrice de la déshydratation du rétinol, et la protection exercée sur sa destruction par les déshydratants, qui viennent d'être mises en évidence dans les lipides d'origine hépatique, ne se retrouvent ni dans l'huile d'olive, ni dans la trioléine.

IIIème PARTIE

APPROCHE ANALYTIQUE DE LA NATURE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL PRESENTE DANS LES LIPIDES DE FOIES

Après avoir constaté la double protection exercée sur le rétinol par les lipides de foies, nous avons tenté d'isoler et de caractériser la substance responsable de cette action.

Dans ce but, nous avons fractionné les lipides totaux par saponification et recherché si l'activité antidéshydratante se retrouvait dans l'insaponification ou avec les acides gras.

Dans un deuxième temps, après chromatographie des lipides, sur alumine ou sur floridine, nous avons regardé si l'action antidéshydratante persistait dans la fraction partiellement privée des glycérides.

Les études précédentes ont permis de conclure que 400 mg de lipides de toutes origines inhibent totalement la déshydratation de 800 µg de rétinol en solution dans 100 ml d'éther de pétrole, par le sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé, utilisé à la concentration de 2 %; en conséquence dans toutes nos expériences de fractionnement, nous avons conservé cette concentration en lipides.

I/- FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS LIPIDIQUES PAR SAPONIFICATION

Protocole expérimental - Saponification -

Les lipides extraits des foies sont traités par de la potasse méthanolique à 5 %, à froid pendant 12 h. l'insaponifiable d'une part, les acides gras d'autre part, sont extraits par de l'éther sans péroxydes. Après évaporation de l'éther, l'insaponifiable ou les acides gras provenant de 100 mg de lipides sont mis en contact avec 2 ml. de la solution de rétinol et de tocophérol renfermant 100 µg/ml. de rétinol, q s. 25 ml d'éther de pétrole et 0 g. 500 de SO^4 Zn 7 OH^2 pulvérisé. Cette solution renferme 8 µg/ml de rétinol.

L'apparition de l'anhydrorétinol a été suivie après chromatographie de 5 ml de cette solution sur 2 grammes d'alumine, par la lecture au spectrophotomètre des densités optiques des premières fractions de l'éluat.

1°/- Action des acides gras sur la déshydratation du rétinol par le sulfate de zinc

Les acides gras ne possèdent aucune action inhibitrice sur la déshydratation du rétinol. Dans ces expériences, la vitamine A est rapidement détruite, comme on pouvait le penser.

2°/- Action de l'insaponifiable sur la déshydratation du rétinol par le sulfate de zinc

Nos premiers essais ont porté sur les lipides extraits de foies de merlans. L'insaponifiable total de 100 mg de lipides est mis en contact avec une solution de rétinol et de tocophérol dans l'éther de pétrole renfermant 200 µg pour 25 ml de rétinol en présence de 2 % de sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé.

Le tableau XXIII exprime en densités optiques à 390 mµ l'anhydrorétinol formé après chromatographie de 5 ml. de la solution.

TABLEAU XXIII

ANHYDRORETINOL A FORME (EXPRIME EN Do à 390mμ) EN PRESENCE DE L'INSAPONIFIABLE DES LIPIDES DE FOIES DE MERLANS

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
0	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Insaponifiable total	0,027	0,050	0,071	0,147	0,412

En présence de l'insaponifiable total de 400 mg de lipides extraits de foies de merlans, la formation d'anhydrorétinol est ralentie pendant les trois premiers jours, mais l'action est beaucoup moins sensible entre le cinquième et le quinzième jour.

Le fractionnement des lipides par saponification entraine la destruction d'une partie de leur activité antidéshydratante puisque l'action de l'insaponifiable de 400 mg est inférieure à celle de 200 mg de lipides totaux.

En conclusion, la substance responsable de l'action protectrice sur la déshydratation du rétinol est extraite avec l'insaponifiable mais la saponification entraine un abaissement de l'activité.

Afin de purifier davantage la substance active et essayer d'en déterminer des caractères physiques ou chimiques, l'insaponifiable total est chromatographié. Pour pallier la perte d'activité due à la saponification, nous avons utilisé les lipides les plus actifs, à savoir ceux extraits de foies de rats.

Fractionnement de l'insaponifiable de lipides extraits de foies de rats -

Protocole expérimental -

L'insaponifiable total de 100 mg de lipides extraits de foies de rats est chromatographié soit sur 2 grammes d'alumine MERCK, soit sur 5 grammes d'argile activée ou floridine X X S; les éluants successifs sont l'éther de pétrole, un mélange éther de pétrole - éther sans péroxyde 9 - 1, éther de pétrole - éther sans péroxyde 5 - 5, puis l'éther sans péroxyde; chaque fraction après évaporation est mise en contact avec 200 µg de rétinol en solution dans 25 ml. d'éther de pétrole, en présence de 2 % de sulfate de zinc pulvérisé.

L'apparition de l'anhydrorétinol est suivie après chromatographie sur alumine de 5 ml. de ces différentes solutions.

A/- Action anti-déshydratante des fractions obtenues par chromatographie sur alumine de l'insaponifiable de lipides de foies de rats

Les fractions ainsi obtenues ne présentent pas d'effet inhibiteur marqué. Il est vraisemblable qu'au cours de la chromatographie sur alumine il intervient des modifications de structure des constituants de l'insaponifiable qui ont pour effet de les inactiver.

B/- Action anti-déshydratante des fractions obtenues par chromatographie sur floridine de l'insaponifiable de lipides de foies de rats.

Le tableau XXIV résume l'évolution des densités optiques à 390 mµ après chromatographie d'une solution renfermant 8 µg/ml. de rétinol en présence, ou de l'insaponifiable total de 4 mg/ml. de foies de rats ou des fractions obtenues après chromatographie sur floridine de cet insaponifiable : déshydra-

tant : sulfate de zinc pulvérisé 2 %.

TABLEAU XXIV

ANHYDRORETINOL FORME (EXPRIME EN Do A 390 mμ) EN PRESENCE DE L'INSAPONIFIABLE TOTAL ET DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DE L'INSAPONIFIABLE SUR FLORIDINE DE LIPIDES EXTRAITS DE FOIES DE RATS

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
0	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Insaponifiable total	0,015	0,020	0,024	0,047	0,150
Fraction 1 - Ether de pétrole	0,123	0,178	0,233	0,342	0,772
Fraction 2 - Ether de pétrole - éther 9 - 1	0,036	0,044	0,050	0,071	0,170
Fraction 3 - Ether de pétrole - éther 5 - 5	0,018	0,022	0,027	0,040	0,172
Fraction 4 - Ether	0,137	0,182	0,241	0,350	0,778

L'insaponifiable total de 400 mg de lipides de foies de rats protège presque totalement le rétinol de la déshydratation pendant 15 jours, mais la destruction de la substance responsable de l'activité antideshydratante par la saponification des graisses est également très importante : 4 mg de lipides totaux ont la même activité que l'insaponifiable extrait de 400 mg.

Après chromatographie de cet insaponifiable sur floridine, l'activité antideshydratante se retrouve répartie dans le mélange éther de pétrole, éther, l'activité des deux fractions est voisine de celle de l'insaponifiable total, le contact avec la floridine n'altère pas la substance active.

En conclusion, l'insaponifiable possède, à un degré moindre, l'action inhibitrice de la déshydratation du rétinol des lipides totaux, mais la fragilité de la substance responsable de cette action déjà mise en évidence lors de la conservation des lipides explique sa destruction partielle par saponification.

Nous avons alors fait appel à des essais de fractionnement des extraits lipidiques par chromatographie.

II/- FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS LIPIDIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE

A/- Chromatographie sur alumine

Protocole expérimental -

100 mg d'huile de foie dissous dans 5 ml d'éther de pétrole sont versés sur une colonne contenant 10 gr. d'alumine.

Les éluants successifs sont l'éther de pétrole et un mélange éther de pétrole, éther sans péroxydes dans les proportions suivantes :

- éther de pétrole - environ 150 ml.
- " " 9 - 1 " 100 ml.
- " " 5 - 5 " 150 ml.
- éther sans péroxydes " 150 ml.

Nous avons fini les chromatogrammes le plus rapidement possible sans jamais utiliser le vide pour les accélérer.

Les fractions recueillies sont évaporées, pesées et mises en contact de 200 µg de rétinol (2 ml de la solution mère) contenus dans 25 ml. d'éther de pétrole en présence de 2 % de SO^4 Zn grossièrement pulvérisé.

Les lectures des densités optiques sont faites après chromatographie de 5 ml. de cette solution, régulièrement les 1er, 2ème, 3ème, 5ème et 15ème jours.

1°/- Fractionnement des lipides de foies de merlans

Dans le tableau XXV nous représentons l'anhydrovitamine A formée exprimée en densité optique à 390mμ isolée après chromatographie de 5 ml de la solution de rétinol dans l'éther de pétrole (8μg/ml), en présence des fractions provenant de la chromatographie de lipides de foies de merlans : déshydratant : SO^4 Zn 2 %.

TABLEAU XXV

ANHYDRORETINOL (EXPRIME EN Do à 390mμ) FORME EN PRESENCE DES DIFFERENTES FRACTIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE DE 100 mg D'HUILE DE FOIES DE MERLANS SUR 10 g. D'ALUMINE

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
Témoin sans lipides	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Fraction 1 Ether de pétrole	0,104	0,210	0,289	0,348	0,741
Fraction 2 Ether de pétrole - Ether 9 - 1	0,028	0,062	0,084	0,110	0,249
Fraction 3 Ether de pétrole - Ether 5 - 5	0,027	0,030	0,041	0,040	0,054
Fraction 4 Ether sans péroxydes	0,032	0,062	0,095	0,140	0,380

Après examen du tableau XXV, nous constatons que la fraction 3 (éther de pétrole, éther 5 - 5) inhibe la déshydratation du rétinol pendant 15 jours, mais que les fractions 2 et 4 ont elles aussi une certaine activité.

Le partage de l'activité entre trois fractions nous a semblé peu satisfaisant, aussi nous avons, avec des lipides d'origines différentes, cherché si ce phénomène se reproduisait.

2°/- Fractionnement des lipides de foies de maquereaux

Avec les mêmes conditions expérimentales, nous avons fractionné les lipides de foies de maquereaux; nous donnons les résultats dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

ANHYDRORETINOL (EXPRIME EN Do à 390 mμ) FORME EN PRESENCE DES DIFFERENTES FRACTIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE DE 100 mg D'HUILE DE FOIES DE MAQUEREAUX SUR 10 g. D'ALUMINE

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
Témoin sans lipides	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Fraction 1 Ether de pétrole	0,127	0,180	0,210	0,347	0,730
Fraction 2 Ether de pétrole - Ether 9 - 1	0,121	0,172	0,207	0,340	0,690
Fraction 3 Ether de pétrole - Ether 5 - 5	0,045	0,070	0,085	0,117	0,274
Fraction 4 Ether	0,095	0,147	0,184	0,270	0,475

La fraction active se retrouve dans l'éther de pétrole éther 5 - 5, les trois autres fractions n'ont pratiquement aucune activité, mais la constatation du rapport quantitatif entre l'anhydrorétinol formé en présence de lipides chromatographiés ou non chromatographiés, permet de s'apercevoir qu'il y a une forte destruction de l'activité après passage sur alumine.

La chromatographie sur alumine des lipides de foies de morues conduit à des résultats identiques, l'activité anti-déshydratante se retrouve dans le mélange éther de pétrole, éther 5 - 5.

Après avoir constaté que le contact avec l'alumine de la substance active entraine une destruction partielle de l'activité antidéshydratante, nous avons alors utilisé la floridine pour fractionner les lipides totaux.

B/- CHROMATOGRAPHIE SUR FLORIDINE

Nous avons utilisé de l'argile activée (floridine XXS) sans traitement préalable et nous avons chromatographié 100 mg d'huile de foies, sur environ 5 gr. de floridine, les éluants sont identiques à ceux utilisés précédemment. Les fractions obtenues après évaporation sont essayées également dans les mêmes conditions expérimentales.

1°/- Fractionnement des lipides de foies de merlans

.../...

TABLEAU XXVII

ANHYDRORETINOL FORME (EXPRIME EN Do à 390mμ) EN PRESENCE DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DE 100 mg DE LIPIDES DE FOIES DE MERLANS SUR FLORIDINE

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
Témoin sans lipides	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Fraction 1 Ether de pétrole	0,042	0,050	0,083	0,172	0,522
Fraction 2 Ether de pétrole - Ether 9 - 1	0,015	0,027	0,038	0,063	0,560
Fraction 3 Ether de pétrole - Ether 5 - 5	0,022	0,035	0,048	0,094	0,585
Fraction 4 Ether	0,018	0,033	0,045	0,074	0,287

En présence des fractions 2 et 3, la formation d'anhydrorétinol est insignifiante pendant les cinq premiers jours, en présence de la fraction 4 l'activité persiste plus longtemps. S'il est intéressant de retrouver une fraction active dans le dernier éluat où les lipides sont les plus éliminés, le fractionnement de l'activité n'est pas satisfaisant.

2°/- Fractionnement des lipides de foies de maquereaux

Les résultats sont portés sur le tableau XXVIII

TABLEAU XXVIII

ANHYDRORETINOL (EXPRIME EN Do à 390 mμ) FORME EN PRESENCE DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DE 100 mg DE LIPIDES DE FOIES DE MAQUEREAUX SUR FLORIDINE

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
Sans lipides	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Fraction 1 Ether de pétrole	0	0	0	0	0,025
Fraction 2 Ether de pétrole - Ether 9 - 1	0,020	0,027	0,040	0,080	0,113
Fraction 3 Ether de pétrole - Ether 5 - 5	0,015	0,055	0,082	0,125	0,265
Fraction 4 Ether	0,017	0,060	0,080	0,120	0,331

La chromatographie ne permet ici aucun fractionnement des extraits lipidiques de foies puisque l'activité antidéshydratante se retrouve dans l'éther de pétrole avec les lipides, mais la floridine n'altère pas la substance antidéshydratante puisque en présence de la fraction 1 il ne se forme pas d'anhydrorétinol. Nous retrouvons l'activité des lipides totaux.

3°/- Fractionnement des lipides de morues

La tableau XXIX représente, comme précédemment, l'anhydrorétinol formé exprimé en densités optiques à 390 mμ en présence des différentes fractions de la chromatographie.

TABLEAU XXIX

ANHYDRORETINOL (EXPRIME EN Do à 390 mμ) FORME EN PRESENCE DE FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR FLORIDINE DE 100 mg DE LIPIDES DE FOIES DE MORUES

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
Sans lipides	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Fraction 1 Ether de pétrole	0,079	0,258	0,382	0,632	1,015
Fraction 2 Ether de pétrole - Ether 9 - 1	0,087	0,250	0,405	0,647	1,070
Fraction 3 Ether de pétrole - Ether 5 - 5	0,050	0,093	0,125	0,188	0,386
Fraction 4 Ether	0	0	0	0,072	0,122

Les deux premières fractions n'inhibent pas la déshydratation du rétinol. Dans l'éther de pétrole éther 5 - 5, nous constatons la présence d'une certaine activité, mais la fraction éther seul inhibe totalement la déshydratation pendant cinq jours.

La substance active isolée dans la 4ème fraction presque totalement délipidée, se montre alors plus fragile, puisqu'après cinq jours elle semble avoir perdu une partie de son activité.

La chromatographie des huiles de foies de poussins et de rats ne permet aucun fractionnement, l'activité antidéshydratante se retrouve dans l'éther de pétrole avec les lipides.

Discussion -

La comportement des lipides sur floridine et sur alumine est différent suivant leur origine.

Après chromatographie sur alumine nous constatons que l'activité antidéshydratante se retrouve dans le mélange éther de pétrole - éther, mais le contact avec l'alumine altère la substance active. La floridine semble moins dénaturer la substance antidéshydratante puisque dans les fractions de l'éluat nous retrouvons la totalité de l'activité des lipides totaux. Mais le fractionnement s'opère différemment suivant la nature des lipides.

C'est la chromatographie sur floridine des lipides de foies de morues qui conduit aux résultats les plus intéressants puisquel'activité se trouve concentrée dans la dernière fraction très débarrassée des lipides; c'est à partir de cette fraction que nous allons décrire les caractères physiques et chimiques mis en évidence.

Etude de la fraction active obtenue dans l'éther après chromatographie sur floridine de lipides de foies de morues

Cette fraction obtenue à partir de 100 mg de lipides se présente sous forme d'un résidu blanchâtre dont le poids moyen est environ de 3,5 mg.

La réaction de Lieberman est jaune-vert fugace. Cette fraction est soluble dans l'éther de pétrole, dans l'éther, insoluble dans l'eau.

Elle est très fragile : conservée quelques jours sous vide elle perd son activité; de même en solution dans l'éther de pétrole elle n'inhibe la déshydratation du rétinol que durant cinq jours.

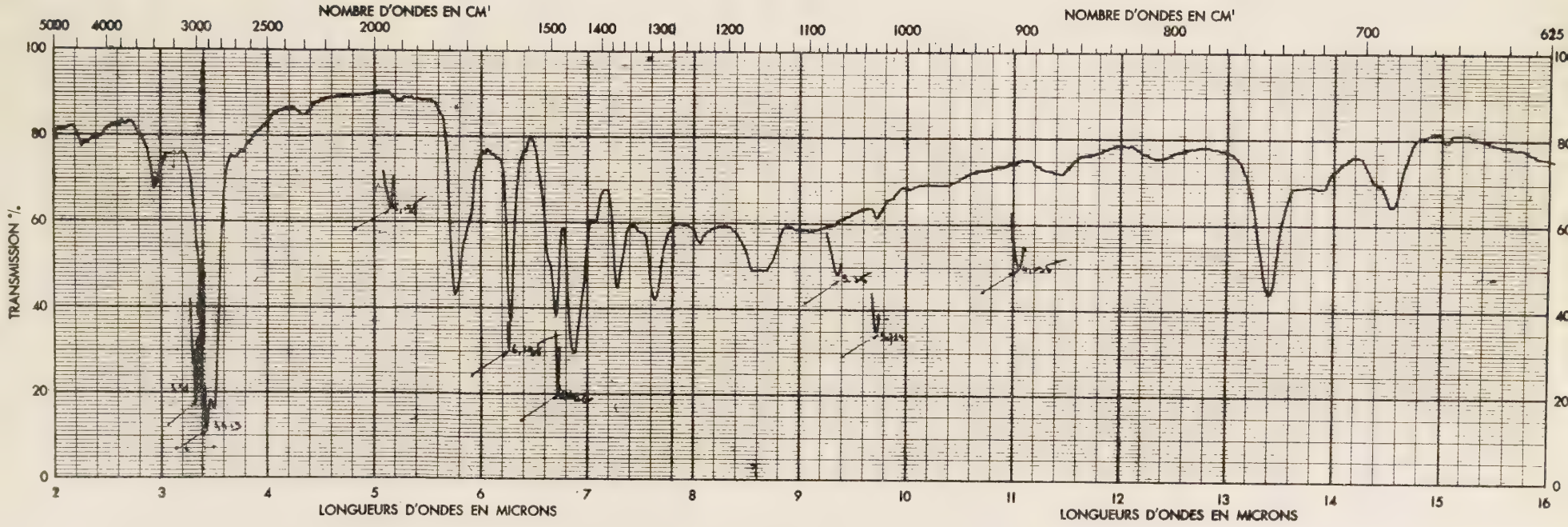


FIGURE 18

Spectre infra-rouge de la fraction 4 de lipides de foies de morues après dissolution dans le C Cl^4 et évaporation sur lame de sel gemme.

La distillation moléculaire ne permet aucune purification car la fraction active ne se sublime pas, même à 120° sous vide.

Elle ne présente pas de spectre d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet.

La figure (18) montre le spectre infra-rouge obtenu après évaporation de la fraction dans le tétrachlorure de carbone sur lame de sel gemme. Les cinq bandes d'absorption sont respectivement situées à 3,4 - 5,8 - 6,25 - 6,70 et 6,85 microns.

III - EXTRACTION APRES SAPONIFICATION ET DIFFUSION LENTE EN MILIEU CALCIQUE

La saponification par les méthodes classiques entraine un abaissement de l'activité antidéshydratante du rétinol des extraits lipidiques de foies; le fractionnement par chromatographie conduit à des résidus riches en lipides et dont les caractères physiques sont peu concluants. Nous avons alors essayé de combiner ces deux méthodes et après chromatographie des lipides, saponification peu brutale, recherché si la fraction active diffusait lentement en milieu calcique, en utilisant une méthode voisine de celle décrite par RAOUL (70) pour l'extraction de la "cétone 250" à partir des huiles de foies.

Protocole expérimental

Nos expériences directes de fractionnement sur alumine ont mis en évidence une activité antideshydratante des lipides chromatographiés, concentrée principalement dans le mélange éther de pétrole - éther 5-5; c'est cette fraction qui sera traitée selon le procédé que nous allons décrire.

100 mg de lipides sont dissous dans 100 ml. d'éther de pétrole et chromatographiés sur une colonne de 1 cm. de diamètre contenant 10 grammes d'alumine.

1/- Elution par l'éther de pétrole jusqu'à épuisement, environ 100 ml. Cette fraction contient la vitamine A_1 et les esters de la vitamine D_3.

2/- Elution par l'éther de pétrole 5 - 5 jusqu'à épuisement (environ 100 ml); cette fraction contient le principe actif et, éventuellement, la vitamine D_3 libre.

Cette deuxième fraction est évaporée, reprise dans 2 ml d'éther sans péroxydes et agitée à chaud avec de la potasse méthanolique à 5 p. 100 (5 ml) puis diluée dans l'eau du robinet (200 ml).

On extrait plusieurs fois à l'éther jusqu'à ce que l'éther ne laisse plus de résidu. ~~On acidifie par 1 ml. d'acide sulfurique à 60°~~, on ajoute de l'éther et on laisse en contact pendant environ 12 h.

La nouvelle extraction par l'éther est lavée à l'eau distillée puis évaporée à sec sous vide. Elle est essayée dans les mêmes conditions sur 200 µg de rétinol contenus dans 25 ml d'éther de pétrole en présence de 2 % de SO^4 Zn 7 OH^2.

ACTION ANTIDESHYDRATANTE DE LA FRACTION OBTENUE

Nos essais ont porté sur les lipides extraits de foies de merlans et de morues. Les résultats donnés dans le tableau (XXX) montrent l'évolution de la densité optique à 390 mµ après chromatographie d'une solution renfermant dans 100 ml. d'éther de pétrole, 800 µg de rétinol et de tocophérol et la fraction obtenue à partir de 400 mg de lipides en présence de 2 % de SO^4 Zn 7 OH^2 pulvérisé.

TABLEAU XXX

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do à 390 mμ A PARTIR DE 800 μg DE RETINOL EN PRESENCE DE LA FRACTION OBTENUE PAR CONTACT ALCALIN DE 400 mg DE LIPIDES DE MERLANS OU DE MORUES, EN SOLUTION DANS 100 ml D'ETHER DE PETROLE SO^4 Zn 7 OH^2 2%

	TEMPS EN JOURS				
	1	2	3	5	15
0	0,130	0,172	0,227	0,342	0,627
Fraction de 400 mg de lipides de merlans	0,040	0,057	0,070	0,096	0,175
Fraction de 400 mg de lipides de morues	0,032	0,039	0,055	0,080	0,141

Par saponification et contact en milieu calcique, nous isolons soit à partir des lipides de foies de morues ou de merlans, une fraction inhibitrice de la déshydratation du rétinol. Si cette technique est moins brutale que la saponification, la diminution d'activité est plus sensible qu'après chromatographie sur floridine puisque l'activité après traitement de 400 mg de lipides est bien inférieure à celle des lipides seuls ou chromatographiés sur floridine.

Caractères de cette fraction -

Ils sont très voisins de ceux décrits sur la fraction obtenue après saponification; seul le poids est plus faible, environ 1 mg.

.../...

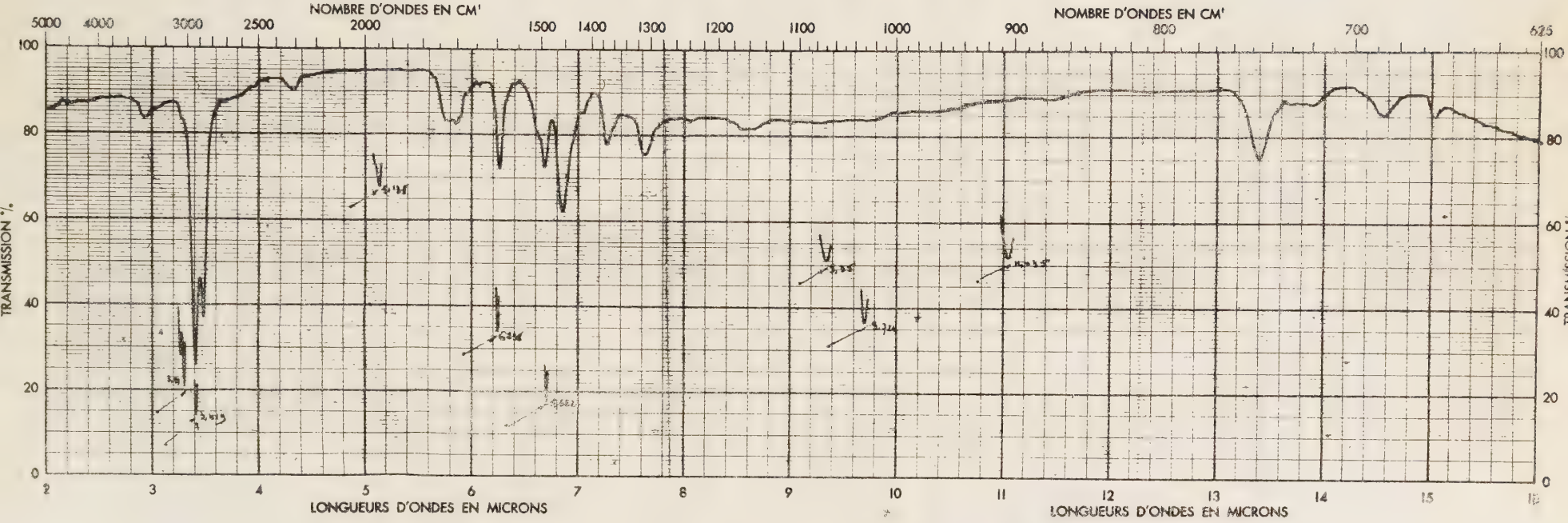


FIGURE 19

Spectre infra-rouge de la fraction obtenue après contact alcalin après dissolution dans le C Cl^4 et évaporation sur lame de sel gemme.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence un spectre d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet; seul le spectre infra-rouge a été réalisé par la même technique que précédemment (Figure 19). Il présente des bandes d'absorption à 3,4, 5,8, 6,25, 6,27 et 6,85 microns.

Discussion -

Il s'avère possible de concentrer l'action anti-déshydratante du rétinol propre aux lipides extraits des foies dans une fraction active sous faible poids, soit par chromatographie, les meilleurs résultats sont obtenus par passage des lipides de foies de morues sur floridine, la fraction active se retrouvant dans l'éther, soit par saponification, mais la saponification suivie de chromatographie entraine la destruction de 75 % de l'activité des lipides. La saponification peu brutale suivie de diffusion lente par contact alcalin permet d'isoler une fraction active avec moins d'altération qu'après saponification par les méthodes classiques, mais d'activité bien inférieure à celle résultant de la chromatographie des lipides sur floridine.

Il est important de signaler que l'origine des lipides entraine un fractionnement différent.

Ces essais ne nous ont pas permis de mettre en évidence un spectre d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet, seul le spectre infra-rouge a pu être déterminé.

Les spectres infra-rouge des fractions actives provenant de lipides de même origine, mais extraites soit après chromatographie sur floridine, soit après diffusion lente en milieu calcique, sont très analogues (figures 18 et 19), seul le spectre infra-rouge de la fraction extraite par diffusion en milieu calcique présente une bande plus large à 5,8 microns.

CONCLUSION DE LA 3ème PARTIE -

L'action antidéshydratante du rétinol mis en évidence dans les lipides de foies se retrouve après fractionnement dans l'insaponifiable.

La substance active se montre extrêmement fragile vis-à-vis des procédés habituels d'extraction. Il est très difficile de l'obtenir privée de lipides, ce qui rend difficile la mise en évidence de caractères physiques ou chimiques précis.

IVème PARTIE

APPROCHE SYNTHETIQUE DE LA NATURE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL PRESENTE DANS LES LIPIDES DE FOIES

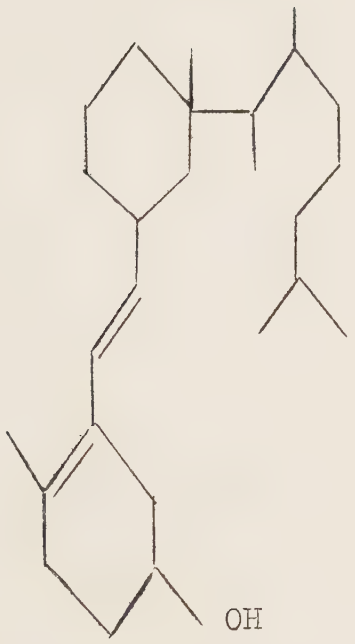
Etant donné les caractères de la fraction lipidique responsable de l'action antidéshydratante : diffusion lente par contact alcalin, réaction de LIEBERMAN faiblement positive, et la difficulté de conduire le fractionnement des lipides de foies, nos recherches se sont orientées vers des composés synthétiques dérivés des stérols, principalement de la vitamine D_3, et résultant de l'action de l'argile activée sur la vitamine D_3, corps susceptible d'exister à l'état naturel dans différentes substances d'origine animale ou végétale.

Parmi ces corps, nous avons utilisé dans notre travail l'isotachystérol 3 (8), le diene-diol (9), la cétone 250 (68), et également d'autres stéroïdes de la même origine que les précédents mais dont la structure chimique n'est pas élucidée.

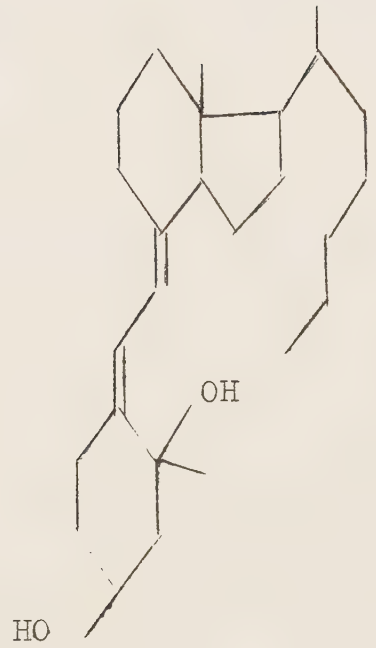
GENERALITES SUR L'OBTENTION DES STEROIDES RESULTANT DE L'ACTION DE LA FLORIDINE ACTIVEE SUR LA VITAMINE D^3

La préparation de ces stéroïdes a été décrite par BARON (7). Rappelons qu'ils sont obtenus par absorption à froid de la vitamine D_3 en solution dans C Cl^4 sur la floridine activée par chauffage, suivie d'une élution éthérée de la floridine et d'une chromatographie sur alumine de Merck.

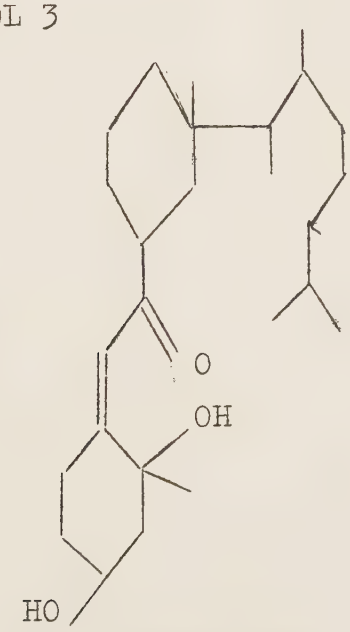
Ces stéroïdes dont nous rappelons les formules dans la figure (20) possèdent un noyau B ouvert et un système diénique ou triénique.



ISOTACHYSTEROL 3



DIENE - DIOL 3



CETONE 250

FIGURE 20

L'isotachystérol (3) dont la préparation et les propriétés sont décrites dans la thèse de BARON (7) présente un spectre d'absorption dans l'ultra-violet avec un maximum situé à 290 mμ
E = 32.000 (figure 21)

Le diol d'hydratation de la vitamine D_3 ou diène-diol présente dans l'ultra-violet un maximum situé à 250 mμ d'une intensité extraordinaire E = 96.000 (figure 22)

La cétone 250 a un spectre ultra-violet caractérisé par un maximum intense à 250 mμ E = 22.000 et un deuxième maximum faible à 310 mμ (figure 23)

Le spectre infra-rouge montre l'existence de la fonction cétone (figure 24).

Outre ces trois corps, nous avons utilisé d'autres stéroïdes très voisins de la cétone 250 dont nous décrirons plus loin la préparation et les caractères qui ont pu être mis en évidence.

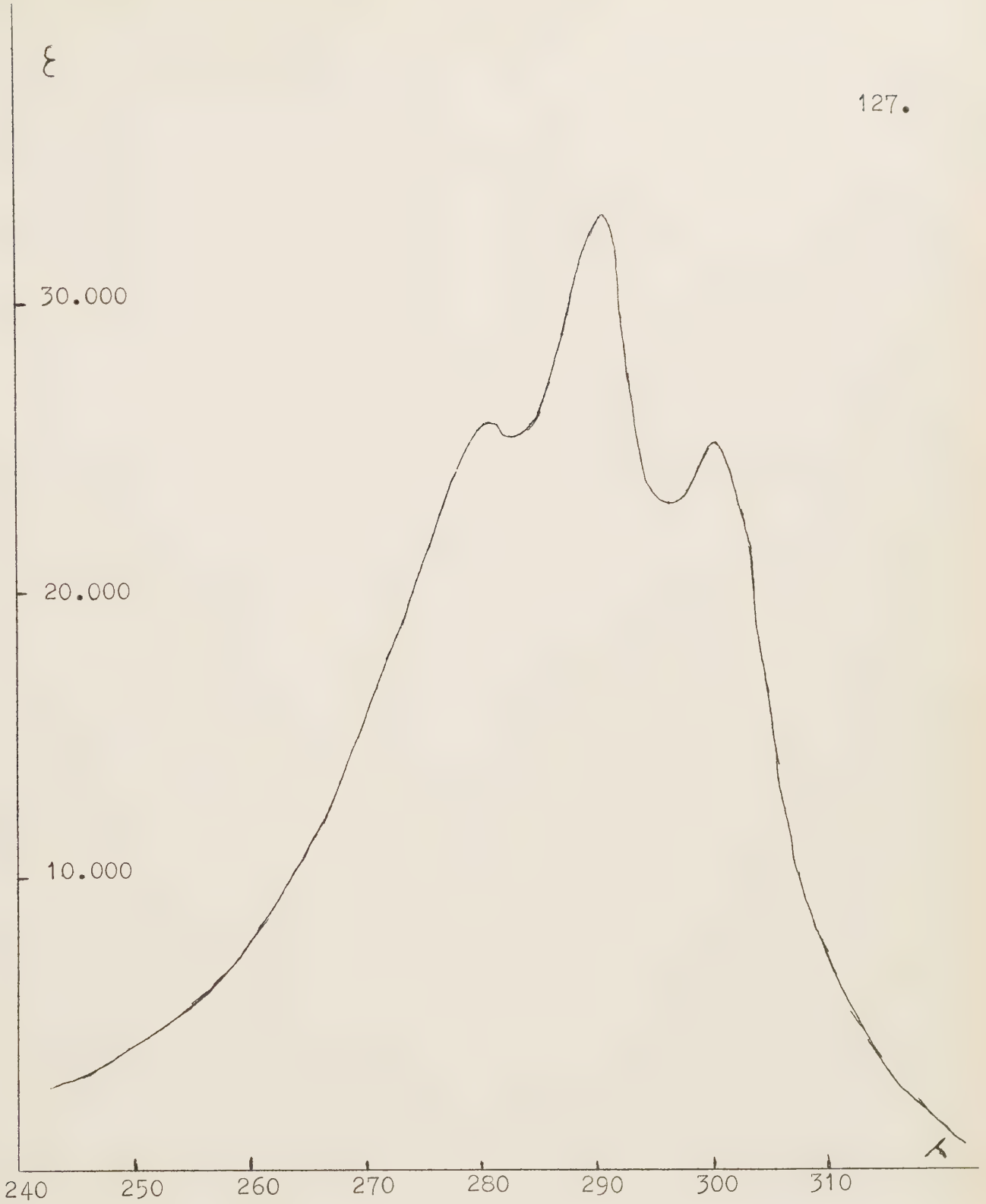


FIGURE 21

SPECTRE DE L'ISOTACHYSTEROL 3

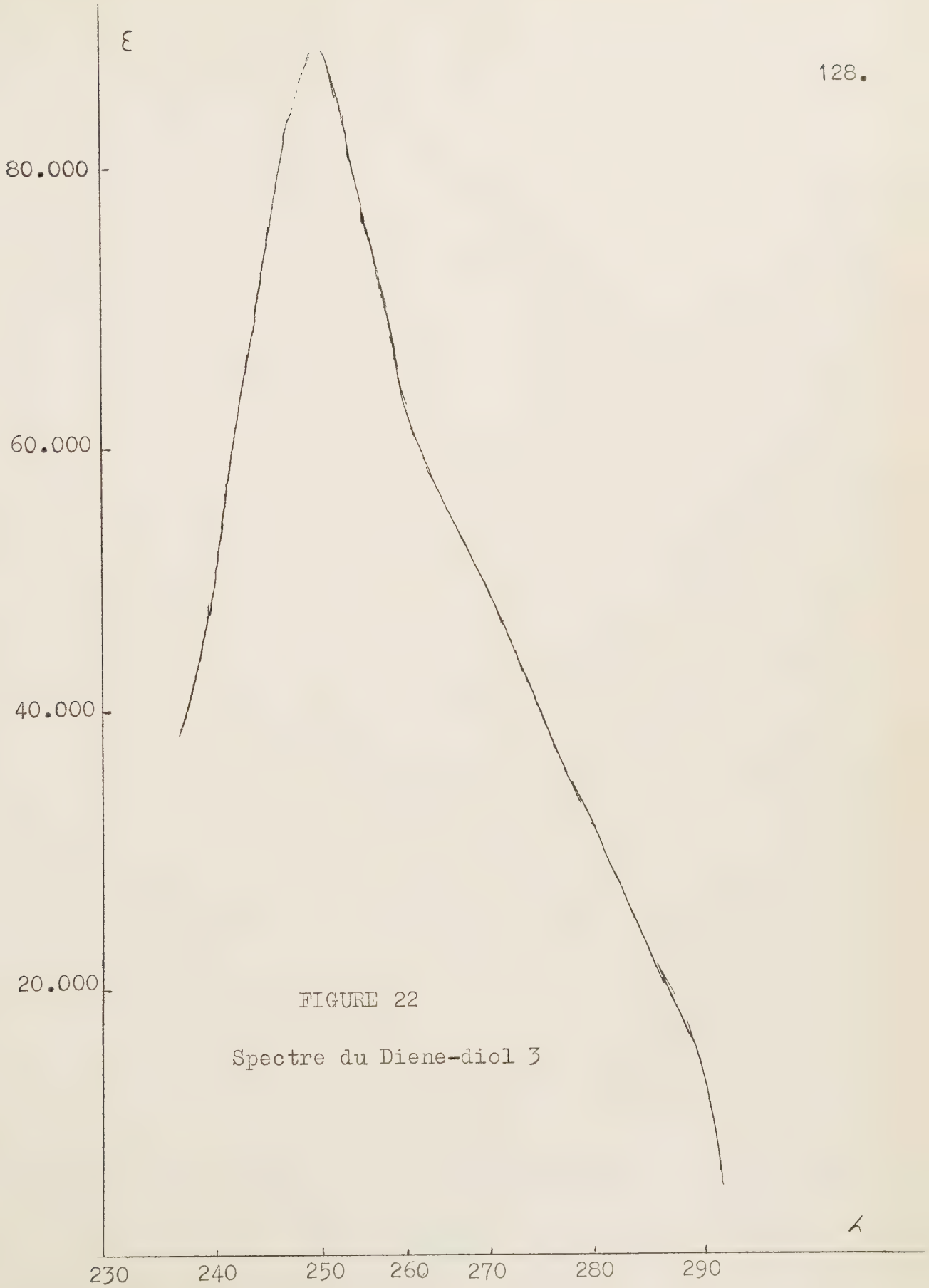


FIGURE 22

Spectre du Diene-diol 3

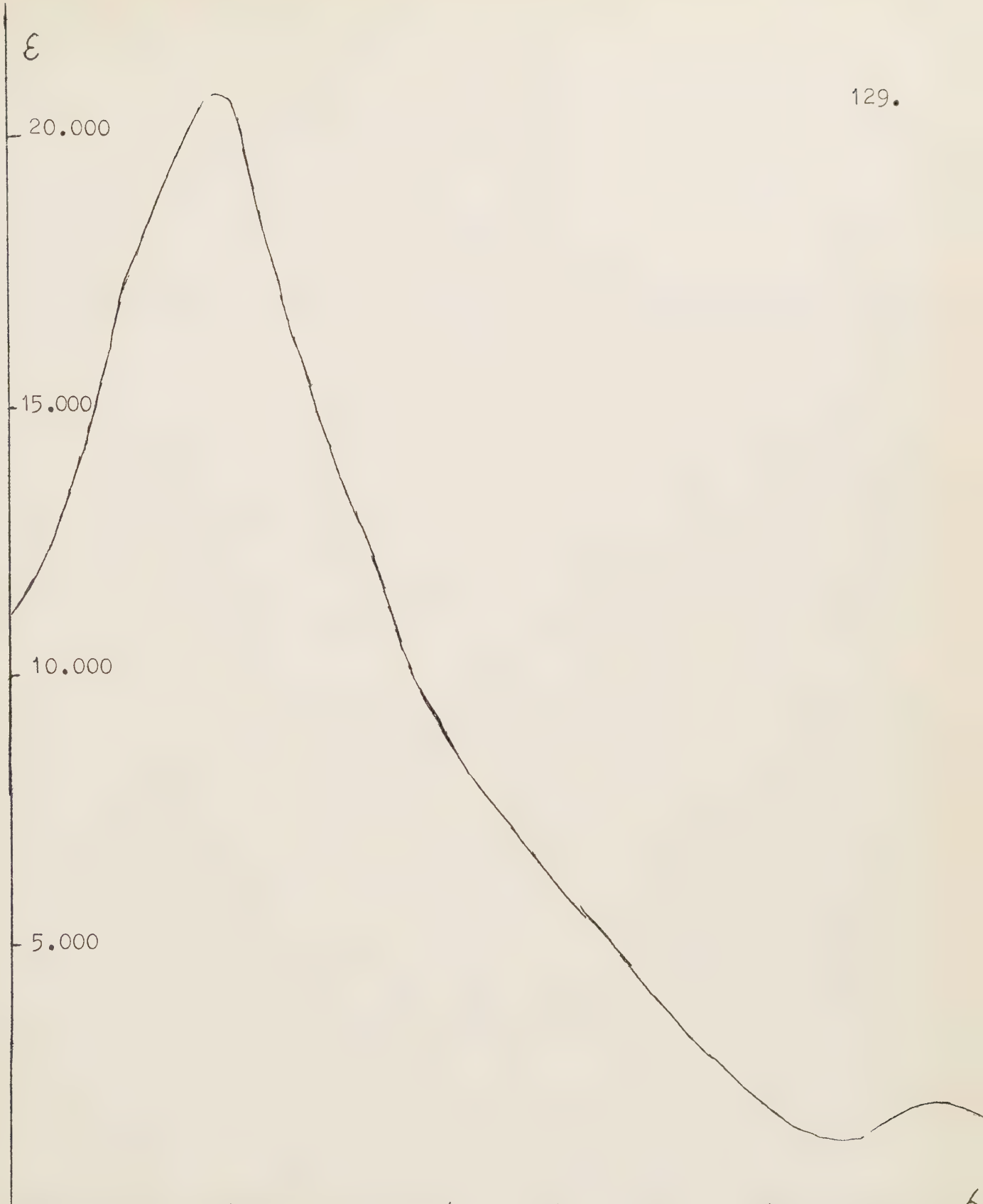


FIGURE 23

Spectre de la "cetone 250"

IVème PARTIE

CHAPITRE I

ETUDE DE L'ACTION ANTIDESHYDRATANTE DES STEROIDES DERIVES DE LA VITAMINE D_3

Nous avons systématiquement étudié l'action protectrice sur la déshydratation du rétinol de la vitamine D_3 et des stéroïdes dérivés de la vitamine D_3, la plupart, de structure connue, dihydrotachystérol (8), diol d'hydratation de la vitamine D_3 ou diene-diol (9), cétone 250 (68), mais également quelques uns de structure chimique non encore élucidée, que nous désignerons par leurs maxima d'absorption dans l'ultra-violet (corps 250 - 290).

Pour plus de clarté dans notre exposé, nous donnerons dans un premier temps les résultats obtenus avec les corps dont la structure chimique est connue avec certitude. Dans un deuxième temps, nous rappellerons qu'en accord avec des observations publiées depuis peu par RAOUL (71), la vitamine D_3, d'origine Merck ou Phillips Roxane, très récente, contrôlée pour ses normes Codex, conduit à des produits de transformation différents qui, dans le cadre plus particulier de nos travaux, n'ont pas la même action. Nous décrirons donc leur mode d'obtention et leurs propriétés avant d'étudier leur activité vis-à-vis de la déshydratation du rétinol.

.../...

I - ACTION PROTECTRICE SUR LA DESHYDRATATION DU RETINOL DE STEROIDES DE STRUCTURE CONNUE

1/- Action de la vitamine D_3

Nous avons utilisé la solution de rétinol et de tocophérol dans l'éther de pétrole renfermant 8 µg/ml en présence de différentes concentrations de D_3 - 8 µg, 100 µg, 500 µg, 1 mg/ml, le déshydratant étant le sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé : 2 %.

Résultats -

La vitamine D_3 est sans action sur la déshydratation du rétinol, la formation d'anhydrorétinol se poursuit régulièrement en présence de D_3 quels que soient la dose et l'échantillon utilisés.

2/- Action de l'isotachystérol 3

L'isotachystérol 3 (8) fut utilisé aux mêmes concentrations que la vitamine D_3 : 8 µg, 100 µg, 500 µg, 1 mg/ml sur une solution identique de rétinol 8 µg/ml et de tocophérol dans l'éther de pétrole en présence de sulfate de zinc 7 OH^2 2 %.

L'isotachystérol n'exerce aucune action protectrice sur la déshydratation du rétinol.

3/- Action du diene-diol

Le diene-diol étant partiellement insoluble dans l'éther de pétrole, sa concentration dans la solution renfermant le rétinol et le tocophérol fut obtenue par

la détermination du pouvoir absorbant de la solution éthérée pour la radiation λ = 250, la valeur théorique de E étant E 1% /1 cm. = 96.000 pour le diene-diol pur.

Le tableau XXXI représente l'anhydrorétinol formé exprimé en densité optique à 390 mμ isolé après chromatographie de la solution renfermant 8 μg/ml. de rétinol 100 μg/ml de diene-diol dans l'éther de pétrole en présence de tocophérol et de 2 % de sulfate de zinc 7 OH^2.

TABLEAU XXXI

ANHYDRORETINOL (EXPRIME EN Do A 390 mμ) EN PRESENCE DE DIENE-DIOL 100 μg/ml DESHYDRATANT SO^4 Zn 7 OH^2

		TEMPS EN JOURS				
		1	2	3	5	10
DIENE-DIOL	0	0,130	0,172	0,227	0,34[illegible]	0,640
	100 μg/ml	0,041	0,060	0,085	0,127	0,570

Le diene-diol retarde la formation d'anhydrorétinol mais son action, peu durable probablement en rapport avec son manque de stabilité, est limitée à cinq jours. La protection du rétinol exige des concentrations élevées en diene-diol environ 10 fois supérieures à celles du rétinol entrant en jeu dans l'expérience.

4/- Action de la cétone 250

a) Cétone 250 naturelle

Dans les premières expériences, nous avons utilisé de la cétone 250 naturelle, mise à notre disposition par Monsieur le Professeur RAOUL, qui avait été extraite de foies de thon (70).

Le caractère très hygroscopique de ce corps nous a conduits à utiliser le pouvoir absorbant de la solution éthérée à 250 mμ pour déterminer sa concentration E 1% / 1 cm. = 22.000.

Le tableau XXXII montre les modifications de la densité optique à 390 mμ (anhydrorétinol) et à 325 mμ (rétinol) de la solution d'éther de pétrole renfermant 50 μg/ml de cétone 250 - 8 μg/ml, après chromatographie de 5 ml. de cette solution sur 2 grs. d'alumine.

.../...

TABLEAU XXXII

FORMATION D'ANHYDRORETINOL (Do à 390 mμ). COMPORTEMENT DU RETINOL (Do à 325 mμ) EN PRESENCE DE CETONE 250 NATURELLE ET DE DESHYDRATANT. (Chromatographie de 5 ml. de la solution d'éther de pétrole renfermant 8 μg de rétinol, 50 de cétone 250 par ml. en présence de 2 % de $SO^4Zn\,7OH^2$)

		Temps en jours			
		1	5	15	30
Anhydrorétinol Do à 390 mμ Cétone 250	0	0,148	0,381	0,627	0,607
	50 μg/ml	0,020	0,019	0,021	0,027
Rétinol Do à 325 mμ Cétone 250	0	1,124	0,720	0	0
	50 μg/ml	1,140	1,437	1,442	1,430

La cétone 250 naturelle inhibe la formation d'anhydrorétinol et empêche la destruction du rétinol en solution dans l'éther de pétrole en présence de sulfate de zinc. Cette double protection s'exerce d'ailleurs bien au-delà de 30 jours, nous avons constaté que même après un an, il n'y avait que des traces d'anhydrorétinol et que seulement 5 % de la vitamine A se trouvaient détruits.

Il est important de signaler qu'après chromatographie sur alumine la cétone 250 pouvait être retrouvée dans les dernières fractions de l'éluat, tout au long de l'expérience.

b) Cétone 250 synthétique

Ces résultats extrêmement encourageants nous ont conduits à utiliser la cétone 250 synthétique préparée à partir de la D_3 : BARON (7).

La cétone 250 synthétique fut utilisée à plusieurs concentrations 20 µg, 50 µg, 100 µg/ml dans une solution d'éther de pétrole renfermant du rétinol 8 µg/ml du tocophérol, du sulfate de zinc 7 OH^2 2 % comme précédemment. La formation d'anhydrorétinol fut suivie dans les mêmes conditions.

TABLEAU XXXIII

FORMATION D'ANHYDRORETINOL (EXPRIME EN Do à 390 mµ) EN PRESENCE DE CETONE 250 SYNTHETIQUE - CHROMATOGRAPHIE DE 5 ml DE LA SOLUTION RENFERMANT 8 µg/ml DE RETINOL - 20, 50 ou 100 µg/ml de cétone 250 (SO^4 Zn 7 OH^2 2 %)

		Temps en jours		
		1	2	5
Cétone 250	0	0,130	0,172	0,342
	20 µg /ml	0,091	0,180	0,407
	50 µg /ml	0,039	0,070	0,348
	100 µg /ml	0	0,090	0,223

20 µg/ml de cétone 250 se montrent sans action, par contre 50 et 100 µg inhibent la formation d'anhydrorétinol, action très brève puisqu'elle ne dure que deux jours; en rapport avec ce phénomène nous remarquons qu'après 24 h., il est impossible de caractériser

la cétone 250 dans le milieu de l'expérience; il semble qu'elle se détruise très rapidement, ce qui explique l'inhibition de la formation d'anhydrorétinol limitée à 48 heures.

La différence de comportement de la cétone 250 naturelle avec une cétone 250 synthétique, en présence de déshydratant dans un milieu éther de pétrole, l'utilisation ultérieure d'un corps fourni par Monsieur RAOUL, qui se trouve très voisin de la cétone 250 mais dont le spectre ultra-violet présente deux maxima situés respectivement à 250 et à 290 mμ dont l'intensité de l'absorption à ces longueurs d'onde est très voisine, et les résultats intéressants obtenus avec ce corps, nous ont conduits à traiter la vitamine D_3 par la floridine activée et essayer systématiquement les produits formés.

II - ACTION PROTECTRICE SUR LA DESHYDRATATION DU RETINOL DE FRACTION STEROIDIQUE DE STRUCTURE ENCORE INCONNUE

Les fractions stéroïdiques de structure non encore définie étudiées dans ce paragraphe proviennent également du traitement de la vitamine D_3 par la floridine activée. Nous allons décrire la technique utilisée pour les obtenir, étudier leur action protectrice sur la déshydratation du rétinol et exposer les caractères des fractions stéroïdiques actives.

1/- Préparation de fractions stéroïdiques à partir de la D_3

Nous devons tout d'abord insister sur les différences importantes relevées entre divers lots de D_3, ce qui nous conduit à donner l'origine et le numéro du lot utilisé.

La floridine (7) activée par chauffage (7) doit être conservée à l'étuve à 100° jusqu'au moment de son emploi et utilisée après refroidissement.

100 mg de vitamine D_3 MERCK ou PHILIPS ROXANE (lots utilisés : MERCK N° 231.191 et PHILIPS ROXANE n° G 139.174 V) sont dissous dans 20 ml de tétrachlorure de carbone RP; on ajoute par petites portions en agitant 5 grs. de floridine et on abandonne 24 heures à l'obscurité. On filtre le tétrachlorure de carbone, on ajoute 100 ml d'éther et on laisse en contact 3 heures, on recueille l'éther, on ajoute de nouveau 50 ml d'éther, après 1 heure de contact on recueille l'éther et on termine l'extraction de la floridine par 25 ml d'acétone, on laisse en contact 10 minutes. Les deux solvants sont évaporés à sec sous vide; le résidu est repris par l'éther de pétrole purifié et chromatographié sur alumine MERCK n° 1097. Les éluants successifs utilisés sont : éther de pétrole, éther de pétrole éther 9 - 1, éther de pétrole éther 5 - 5, éther.

Chaque fraction est ensuite évaporée, le résidu est repris dans l'éther pour la détermination de son spectre d'absorption dans l'ultra-violet, le résidu est ensuite pesé après évaporation et un poids déterminé est mis en contact avec le rétinol en solution dans l'éther de pétrole en présence de sulfate de zinc $7\ OH^2$ - 2 %.

2/- Etude de l'action protectrice sur la déshydratation du rétinol des fractions obtenues

A/- Dans l'éther de pétrole nous sommes en présence d'un corps dont le spectre ultra-violet présente un seul maximum à 290 mμ.

Ce corps se montre sans action sur la déshydratation du rétinol.

B/- Dans l'éther de pétrole éther 9-1, avec un lot de D_3 n° G 139 origine PHILIPS ROXANE, nous avons isolé de la cétone 250, caractérisée par son spectre d'absorption dans l'ultra-violet, par sa transformation en énolate calcique et le passage du maximum d'absorption UV à 265 mμ, l'acidification entrainant le retour à la forme cétonique (68).

L'action inhibitrice sur la déshydratation du rétinol est conforme avec ce que nous venons d'exposer sur la cétone 250 synthétique.

Avec des lots de D_3 n° 231.191 origine MERCK et certaines préparations commerciales actuelles de vitamine D_3, nous isolons un corps dont le spectre d'absorption dans l'ultra-violet présente deux maxima situés respectivement à 250 et 290 mμ. Ce corps, après saponification et extraction par l'éther en milieu acide, ne présente plus qu'un maximum à 250 mμ. La courbe de son spectre d'absorption dans l'ultra-violet est différente de celle de la cétone 250 et par enolisation en milieu calcique, le maximum d'absorption ne se déplace pas à 265 mμ.

Cette fraction stéroïdique se montre peu active sur la déshydratation du rétinol par le sulfate de zinc.

C/- Dans l'éther de pétrole éther 5-5 avec le lot de D_3 n° 231.191 MERK et d'autres préparations actuelles de D_3 nous obtenons un corps qui présente deux maxima d'absorption dans l'ultra-viclet situés à 250 et 290 mμ; dont le spectre ne se modifie pas ni par contact alcalin, ni par saponification.

Après évaporation de l'éther et pesée de la fraction nous avons essayé l'action de ce corps sur la déshydratation du rétinol à des concentrations de 4,8, 20 µg/ml. dans l'éther de pétrole renfermant 8 µg/ml de rétinol, du tocophérol et du SO^4 Zn 7 OH^2 - 2 %.

TABLEAU XXXIV

FORMATION D'ANHYDRORETINOL EXPRIME EN Do A 390 mμ EN PRESENCE DE "CORPS 250 - 290" - CHROMATOGRAPHIE SUR ALUMINE DE 5 ml DE LA SOLUTION RENFERMANT 8 µg/ml DE RETINOL 4, 8, 20 µg/ml DE "CORPS 250 - 290" (SO^4 Zn 7 OH^2 - 2 %)

		Temps en jours			
		1	2	5	15
Corps 250 - 290	0	0,130	0,172	0,381	0,627
	4 µg/ml	0,026	0,068	0,165	0,973
	8 µg/ml	0	0,010	0,040	0,140
	20 µg/ml	0	0	0,016	0,075

Il se forme par action de la floridine activée sur certaines vitamines D_3 un corps qui peut être isolé après

chromatographie sur alumine et dont le spectre d'absorption présente deux maxima à 250 - 290mμ. Ce corps inhibe la formation d'anhydrorétinol pendant 15 jours à une concentration de 8 μg/ml; c'est-à-dire analogue à celle du rétinol présent dans la solution.

Lorsque la quantité de ce corps est insuffisante 4 μg/ml la formation d'anhydrorétinol est freinée pendant les cinq premiers jours, mais après 15 jours la densité optique à 390 est plus élevée dans cette solution qu'en l'absence de ce corps, ce qui laisse supposer une protection du rétinol identique à celle des lipides extraits des foies, ce que nous avons vérifié en caractérisant le rétinol restant dans les fractions de l'éluat. Les résultats sont donnés dans le tableau XXXV.

TABLEAU XXXV

STABILITE DU RETINOL SYNTHETIQUE EN PRESENCE DE CORPS "250-290" ISOLEMENT APRES CHROMATOGRAPHIE DU RETINOL CONTENU DANS LA SOLUTION

		Temps en jours				
		1	2	3	5	15
Corps 250 - 290	0	1,368	0,792	0,410	0,365	0
	8 μg /ml	1,540	1,540	1,537	1,475	1,410

L'examen de la densité optique lue à 325 mμ des fractions de l'éluat montre qu'en présence de la fraction stéroïque "250 - 290" à la concentration de 8 μg /ml le rétinol n'est pas détruit par le sulfate de zinc.

Détermination de quelques caractéristiques chimiques de cette fraction

La fraction stéroïdique active peut être préparée facilement par action de la floridine sur certains lots de D_3 et isolée par chromatographie sur alumine, elle est généralement éluée par un mélange éther de pétrole, éther 5-5.

Son existence avait déjà été signalée par M. PRELOT (66) qui avait étudié son activité hyperalcémiante. Les caractères physiques que donnait M. PRELOT ont été vérifiés.

- pouvoir rotatoire dans le chloroforme + 80
- point de fusion du dérivé acétylé 54-58°

Environ 10 % de la vitamine D_3 se transforment en ce corps.

La figure (25) montre le spectre infrarouge de cette fraction qui est très proche de celui de la cetone 250 (figure 24).

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet déterminé dans l'éther sans peroxyde présente deux maxima situés à 250 et 290 mμ avec une absorption voisine de ces deux maxima (figure 26).

Discussion -

Par deux voies différentes nous avons été mis en présence soit de fractions lipidiques d'origine naturelle, soit de fractions stéroïdiques d'origine synthétique qui exercent une action identique sur la déshydratation du rétinol de synthèse; inhibition de la déshydratation et de la destruction du rétinol.

La réaction colorée de LIEBERMAN est positive avec les deux fractions, ce qui peut laisser supposer la nature

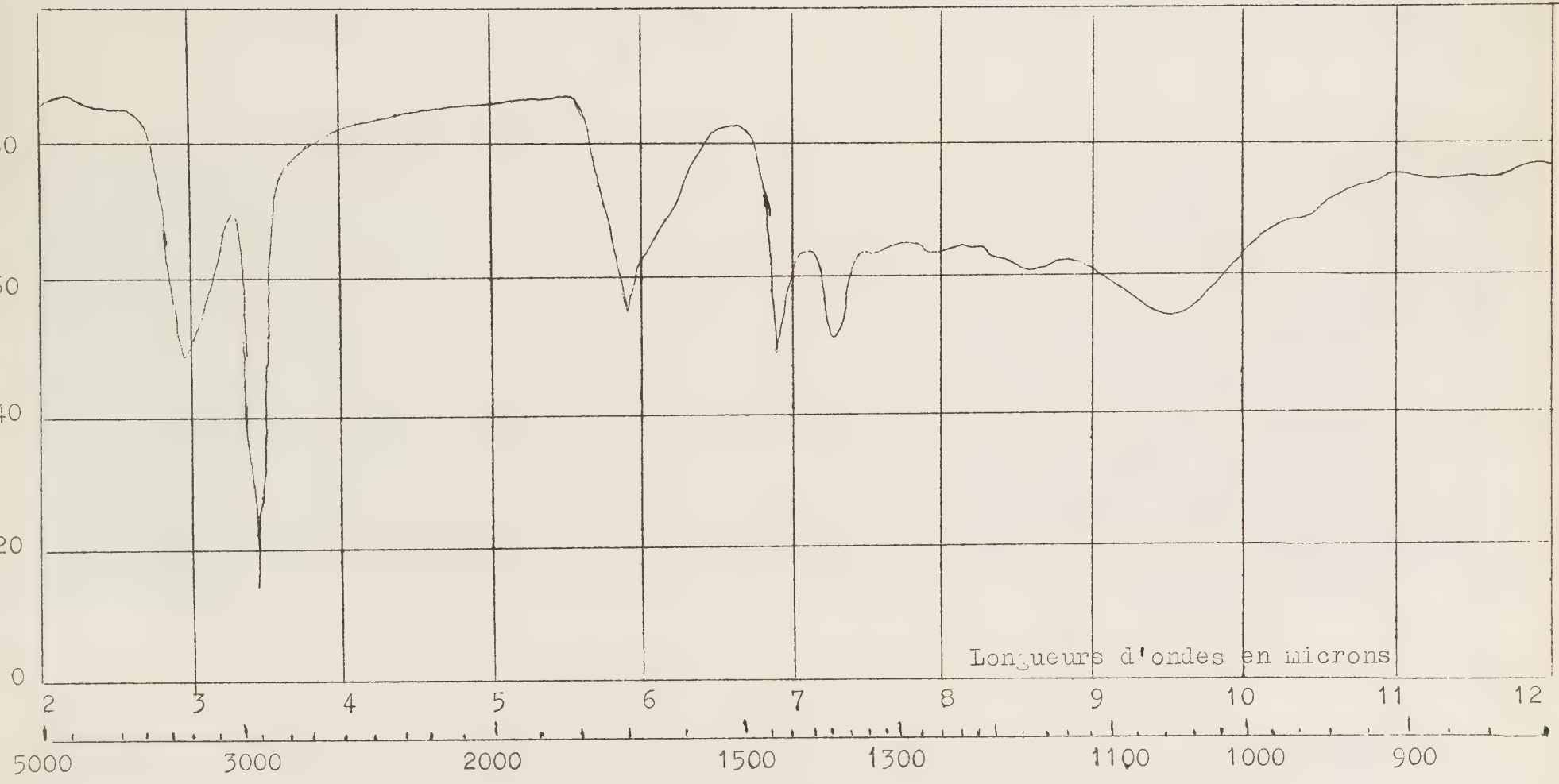


FIGURE 24

SPECTRE INFRA-ROUGE DE LA "CETONE 250" DE SYNTHESE

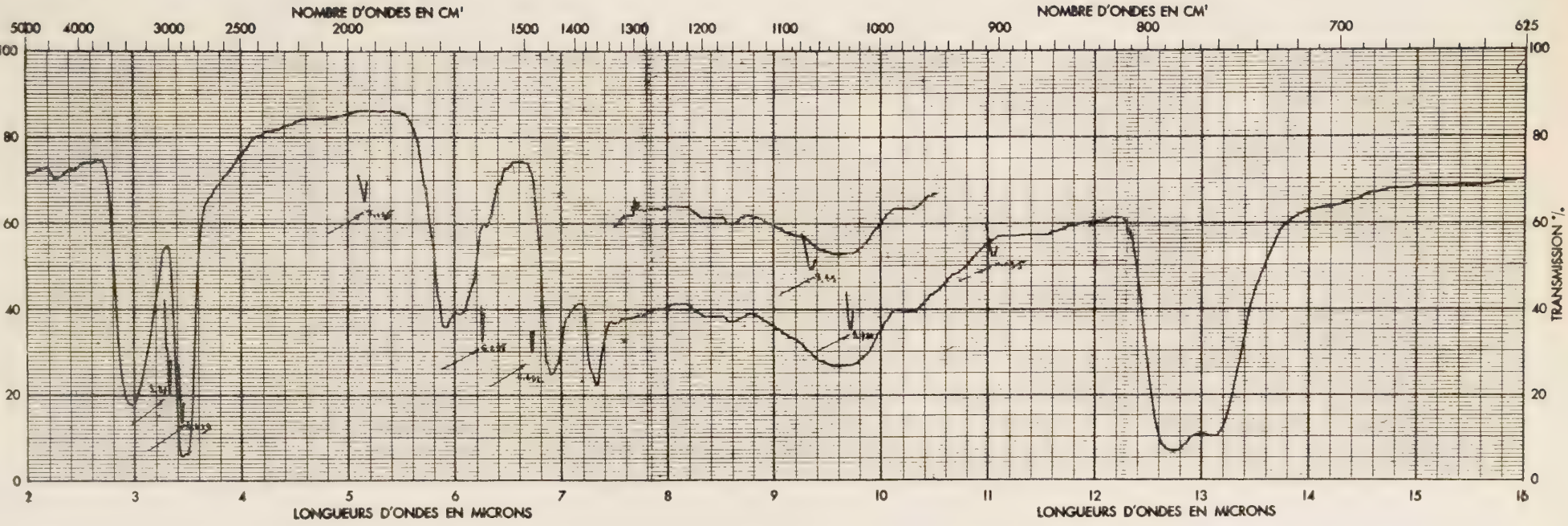


FIGURE 25

Spectre infra-rouge obtenu après évaporation sur lame de sel gemme de la fraction "250-290"

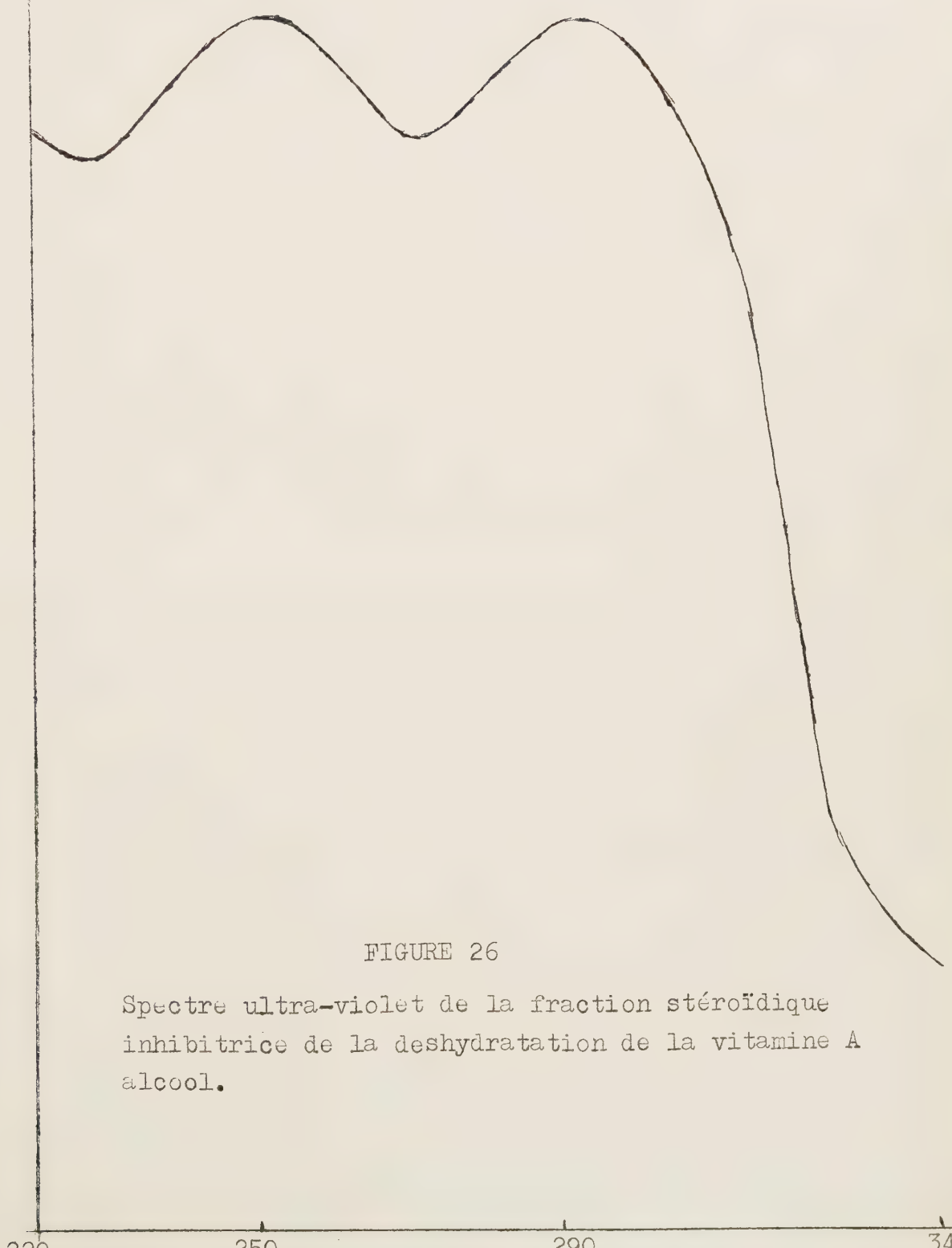


FIGURE 26

Spectre ultra-violet de la fraction stéroïdique inhibitrice de la deshydratation de la vitamine A alcool.

stérolique de l'extrait lipidique actif. Mais les difficultés rencontrées pour purifier cet extrait ne nous ont pas permis de mettre en évidence un spectre d'absorption dans l'ultra-violet caractéristique; cette absence de purification est très visible dans le spectre infra-rouge où nous avons décelé les bandes caractéristiques des lipides restants.

Sans émettre de conclusions trop hâtives nous pouvons constater l'analogie d'action de ces deux fractions d'origine différente et il n'y a pas impossibilité à penser que ces stéroïdes peuvent également exister à l'état naturel dans les lipides animaux.

Afin de poursuivre dans cette voie, nous avons utilisé des lipides extraits de foies d'animaux qui avaient reçu de la vitamine D_3, de la cétone 250, du corps "250-290" ou carencé en vitamine D_3, et comparé l'action protectrice de ces lipides sur le rétinol, avec celle de lipides provenant d'animaux témoins.

Etude de l'action antidéshydratante de lipides provenant de foies d'animaux : poussins ou rats ayant reçu soit de la D_3, soit du corps "250 - 290", soit carencés en vitamine D_3

Les foies de rats ou de poussins provenaient d'animaux de l'élevage de M. RAOUL, les poussins de race Leghorn ou New-Hampshire recevaient comme régime de base celui de l'Association of Agricultural chemists (62). Les rats recevaient un régime RANDOIN (67) modifié par RAOUL (37).

La vitamine D_3 ou les corps étudiés ont été administrés avec une sonde par voie bucale en solution dans l'huile d'arachide. Les animaux témoins ont reçu le même volume d'huile d'arachide. Les animaux recevaient 0,05 µg de D_3 par jour ou 0,5 µg des autres stéroïdes.

Le foie est prélevé dès la mort de l'animal et conservé dans le chloroforme. Les lipides sont extraits dans les mêmes conditions que précédemment et mis en contact avec une solution

de rétinol (8 µg/ml) et de tocophérol dans l'éther de pétrole, l'acide chlorhydrique 0,0005 N étant utilisé comme déshydratant.

A/- Action de lipides extraits de foies de rats, soit carencés en D_3, soit ayant reçu de la D_3

Les lipides furent utilisés à la concentration de 4 - 20, 40 mg %, l'anhydrorétinol formé est exprimé en densité optique lue à 390 mµ après 1 h., 2 h., 24 h.

TABLEAU XXXVI

ANHYDRORETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mµ A PARTIR D'UNE SOLUTION RENFERMANT 8 µg/ml DE RETINOL EN PRESENCE D'H Cl 0,0005 N ET DE LIPIDES

Lipides en mg %	Temps en heures		
	1 h.	2 h.	24 h.
Témoin sans lipides	0,164	0,295	1,052
Rat témoin			
4 mg	0,131	0,322	1,092
20 mg	0,055	0,076	0,476
40 mg	0	0	0,110
Rat carencé			
4 mg	0,090	0,230	1,140
20 mg	0,030	0,061	0,397
40 mg	0	0	0,127
Rat + D_3			
4 mg	0,072	0,187	1,150
20 mg	0,020	0,050	0,186
40 mg	0	0	0,017

Après l'examen du tableau (XXXVI) nous constatons l'action identique des lipides provenant des foies des animaux carencés et ceux des animaux témoins. Par contre, les lipides extraits des foies de rats ayant reçu de la vitamine D_3 se montrent plus actifs; si, dans les deux cas, 4 mg % de lipides n'inhibent pas la formation d'anhydrorétinol, 20 mg de ces mêmes lipides diminuent environ de moitié la quantité de l'anhydrorétinol formé comparativement aux témoins; 40 mg protègent totalement le rétinol pendant 24 heures alors qu'en présence des lipides témoins la densité optique est de 0,110.

Les lipides extraits des foies de rats ayant reçu de la vitamine D_3 exercent sur le rétinol une protection plus grande que celle des lipides des animaux témoins.

B/- Action de lipides extraits de foies de poussins soit carencés en D_3, soit ayant reçu la vitamine D_3 ou de la fraction "250 - 290"

L'expérience fut reproduite d'une façon analogue à la précédente, mais nous avons eu en plus à notre disposition des foies de poussins traités par la fraction "250 - 290".

Le tableau (XXXVII) montre l'évolution de la densité optique à 390 mμ en présence de quantités croissantes de lipides de ces différentes origines après 1 h., 2 h., 24 h.

.../...

TABLEAU XXXVII

DESHYDRATATION PAR H Cl 0,0005 N D'UNE SOLUTION CONTENANT 8 γ/ml DE RETINOL EN PRESENCE DE LIPIDES DE FOIES DE POUSSINS. ANHYDRO-RETINOL FORME EXPRIME EN Do A 390 mμ.

Lipides en mg %	Temps en heures		
	1 h.	2 h.	24 h.
Témoin sans lipides	0,176	0,357	0,883
Poussins témoins			
4 mg	0,140	0,291	0,860
20 mg	0,030	0,065	0,854
40 mg	0	0,030	0,160
Poussins carencés			
4 mg	0,120	0,237	1,035
20 mg	0,034	0,084	0,605
40 mg	0,010	0,029	0,151
Poussins + "250 - 290"			
4 mg	0,126	0,262	0,946
20 mg	0,055	0,110	0,564
40 mg	0,020	0,048	0,140
Poussins + D_3			
4 mg	0,120	0,219	0,772
20 mg	0,045	0,099	0,465
40 mg	0,012	0,027	0,149

RESULTATS

Quelle que soit leur origine, 4 mg % de lipides se montrent insuffisants pour inhiber la déshydratation du rétinol par l'H Cl 0,0005 N; la formation d'anhydrorétinol se poursuit d'une façon régulière et analogue à celle du témoin (absence de lipides).

En présence de 20 mg % de lipides provenant soit des poussins carencés, soit des poussins témoins, la formation d'anhydrorétinol est arrêtée pendant les deux premières heures mais après 24 heures la concentration est analogue en présence et en l'absence de lipides.

Si les lipides, à cette même concentration, proviennent de poussins ayant reçu de la vitamine D_3, ou de la fraction "250 - 290", la formation d'anhydrorétinol est nettement freinée pendant 24 heures. Ce dernier est de 50 % inférieur à celui trouvé soit en l'absence de lipides, soit en présence des lipides des animaux témoins ou carencés.

40 mg % de lipides se montrent une concentration excédentaire qui inhibe dans tous les cas la formation d'anhydrorétinol et qui ne permet de saisir aucune différence.

Les foies de poussins traités soit par la vitamine D_3, soit par la fraction "250 - 290", semblent exercer une action protectrice sur le rétinol supérieure à celle des animaux normaux.

CONCLUSION DE LA 4ème PARTIE

Après l'essai de différents stéroïdes sur l'inhibition de la déshydratation du rétinol de synthèse par le sulfate de zinc 7 OH^2, nous pouvons conclure que la vitamine D_3 est sans action, que le diol d'hydratation de la vitamine D_3 ou diene-diol inhibe pendant 5 jours la déshydratation du rétinol, mais à des concentrations élevées par rapport à celles du rétinol entrant en jeu dans l'expérience, que la "cétone 250" de synthèse se montre active pendant une journée mais que la brièveté de son action est probablement en rapport avec sa destruction dans le milieu de l'expérience, que par action de l'argile activée sur la D_3 on peut isoler une fraction stéroïdique dite "250 - 290" en raison de son spectre d'absorption qui, à concentration égale à celle du rétinol, inhibe sa déshydratation et sa destruction et dont l'action est analogue aux lipides extraits des foies d'animaux.

Les lipides de foies d'animaux : poussins et rats traités par de la vitamine D_3 ou par la fraction "250 - 290", protègent, à des concentrations plus faibles que des lipides issus d'animaux normaux, le rétinol.

DISCUSSION GENERALE

Avant de résumer les conclusions de notre travail, il nous a semblé important de préciser certains résultats et de comparer les étapes successives des recherches effectuées.

Dans un premier temps nous avons montré que dans les solvants usuels le rétinol de synthèse peut se déshydrater avec une très grande facilité, mais que dans les mêmes conditions la transformation en anhydrorétinol d'un ester tel que l'acétate est beaucoup plus difficile.

Nous avons ensuite essayé de transformer en anhydrorétinol la vitamine A naturellement présente dans les huiles de foies de poissons et avons constaté que, traitée par les agents deshydratants étudiés précédemment elle ne conduit jamais à l'anhydrorétinol. Or nous savons que les esters du rétinol représentent une grande partie de la vitamine A dans les lipides de foies; est-ce l'estérification qui inhibe cette possible transformation, mais n'est-il pas possible aussi de supposer qu'il existe dans les lipides de foies de poissons un facteur qui protège la vitamine A de la déshydratation.

A l'encontre de la première hypothèse nous avons constaté que l'acétate se transforme, quoique plus lentement que l'alcool, en anhydrorétinol; d'autre part, des recherches postérieures à ce travail ont mis en évidence chez un autre ester synthétique (palmitate) une transformation en anhydrorétinol comparable à celle de l'acétate. Peut-être les esters naturels sont-ils encore plus stables vis-à-vis des déshydratants étudiés, nous n'avons pas continué dans cette voie car notre deuxième hypothèse s'est trouvée confirmée par la mise en évidence d'une inhibation de la déshydratation du rétinol de synthèse en présence de lipides de foies. La déshydratation du rétinol de synthèse par les agents déshydratants décrits

précédemment est soit freinée, soit inhibée en ajoutant en milieu réactionnel des lipides extraits de foies.

Dans un deuxième temps nous avons constaté que les déshydratants transforment particllement le rétinol en anhydrorétinol et en détruisent une importante fraction. La présence de faibles concentrations de lipides empêche cette destruction.

Les lipides de foies peuvent inhiber la déshydratation du rétinol de synthèse, mais si leur concentration est trop faible pour que l'inhibition soit totale, ils freinent la réaction et empêchent le rétinol d'être en partie détruit par les déshydratants étudiés.

Ces constations, l'absence de protection exercée par l'huile d'olive, nous ont laissé supposer qu'il existe dans les lipides de foies un facteur protecteur du rétinol que nous avons essayé d'identifier par les méthodes analytiques.

Puis nous avons utilisé des corps dérivés de la vitamine D_3 et recherché si certains n'exerçaient pas une action identique à celle des lipides de foies.

Ces corps ont la possibilité de s'ioniser facilement; or nous avons supposé que le passage du rétinol ou de l'acétate de rétinol à l'anhydrorétinol était toujours précédé d'une ionisation de la molécule. La protection exercée par le stéroïde n'est-elle pas due à une liaison avec le rétinol d'un type ester, qui rendrait la molécule inattaquable par les agents déshydratants. Il est très probable que la protection exercée, soit par des lipides naturels, soit par des corps synthétiques sur le rétinol, résulte d'une impossibilité pour la molécule de s'ioniser.

CONCLUSIONS GENERALES

La constatation de la stabilité de la vitamine A_1 dans les huiles de foies de poissons pharmaceutiques, en opposition avec sa facile destruction lorsqu'elle est isolée de ce milieu naturel, nous a conduits à entreprendre l'étude d'un aspect particulier de sa transformation, à savoir sa déshydratation qui conduit à l'anhydrovitamine A, corps très peu actif du point de vue biologique.

1°/- Les conditions de transformation de la vitamine A_1 furent d'abord précisées "in-vitro" et pour cela nous avons étudié la formation d'anhydrovitamine A à partir du rétinol et de l'acétate de rétinol.

Le procédé classique décrit par EDISBURY consiste à déshydrater la vitamine A, en la dissolvant dans une solution d'éthanol acide. L'inconvénient de cette méthode est de rendre difficile l'isolement de l'anhydrovitamine A formée, aussi pour transformer la vitamine A_1 en milieu non polaire nous avons fait appel au sulfate de zinc à différents degrés d'hydratation. Nous avons constaté que le rétinol se transforme très facilement en anhydrorétinol, mais que la réaction ne se limite pas à une simple élimination d'eau car deux phénomènes accompagnent la déshydratation, d'une part la destruction du rétinol en présence de déshydratants; d'autre part la transformation de l'anhydrovitamine A en isovitamine A_1.

L'acétate de rétinol se transforme plus difficilement en anhydrorétinol, en particulier le sulfate de zinc 7 OH^2 est sans action.

2°/- Après l'étude du mécanisme de la formation d'anhydrorétinol "in vitro", nous avons entrepris des recherches

parallèles dans les milieux naturels. Nous avons constaté que les lipides extraits des foies d'animaux et que les huiles de poissons conservées ne renferment pas ou seulement des traces d'anhydrorétinol, mais surtout nous avons vérifié que la vitamine A_1 naturelle présente dans ces lipides ne se déshydrate ni par action de l'éthanol chlorhydrique, ni par action du sulfate de zinc. Ces constatations nous ont conduits à chercher à mettre en évidence dans les lipides extraits des foies une substance qui inhibe la déshydratation de la vitamine A_1.

Pour cela nous avons étudié la déshydratation du rétinol de synthèse choisi en raison de sa facile transformation en anhydrorétinol en présence de lipides extraits de foies de différents animaux.

Nous avons constaté que tous les lipides extraits des foies inhibent ou retardent la formation d'anhydrorétinol et empêchent la destruction du rétinol par les déshydratants étudiés.

La protection du rétinol est en rapport avec l'origine des lipides et parmi ceux étudiés, les lipides extraits des foies de rats se montrent les plus actifs.

Parmi les lipides végétaux : l'huile d'olive, et parmi les glycérides synthétiques la trioléine, sont sans action, cette propriété protectrice de la vitamine A_1 semble être probablement spécifique des lipides d'origine animale.

L'approche analytique de la substance présente dans les lipides extraits des foies inhibant la déshydratation du rétinol, nous a amenés à conclure que cette substance n'était pas de nature lipidique, qu'on pouvait l'extraire avec l'insaponifiable. Elle donne une réaction de Lieberman faiblement positive et elle se montre fragile, soit soumise aux procédés

habituels d'extraction, soit partiellement privée de lipides : dans ces deux cas, elle perd rapidement une partie de son activité.

Dans la quatrième partie nous avons cherché à rapprocher l'action des lipides hépatiques, de stéroïdes provenant de la vitamine D_3.

Successivement nous avons utilisé le diol d'hydratation de la vitamine D_3, qui se montre actif, mais à forte concentration, la cétone 250 dont l'action très brève est en rapport avec sa destruction dans le milieu de l'expérience et un troisième stéroïde, caractérisé seulement par son spectre d'absorption dans l'ultra-violet présentant deux maxima à 250 et 290 mμ qui se montre très actif même à très faibles concentrations.

L'action de ce stéroïde est parallèle à celle des lipides extraits de foies de poissons, il inhibe la déshydratation et la destruction du rétinol, par le sulfate de zinc.

L'utilisation alors de lipides extraits de foies d'animaux soit carencés en vitamine D_3, soit ayant reçu de la D_3, de la cétone 250 ou du corps "250-290" a seulement mis en évidence une action protectrice plus importante des lipides provenant d'animaux ayant reçu de la vitamine D_3 mais les conclusions que nous pouvons tirer de ces dernières expériences demeurent encore incertaines.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ADAMSON D.C.M., ELVIDGE W.F., GRIGEMAN N.T., HOPKINS E.H., STUKEY R.E., TAYLOR R.J., Analyst, 1951, 76;445

2 - AMES S.R., SWANSON W.J., HARRIS P.L., J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, 4136

3 - ARENS J.F., VAN DORP D.A., Nature 1946, 158, 622

4 - AWAPARA J., MATTSON F.H., MEHL J.W., PEVEL Jr. H.J., Science 1946, 104, 602

5 - BALL J., GOODWIN T.W. R.A., Biochem. J., 1948, 42, 516

6 - BARUA K., MORTON R.A., Biochem. J., 1949, 45, 308

7 - BARON C., Thèses Sciences, Paris 1956

8 - BARON C., BILLET D., LE BOULCH N. Bull. Soc. Chim. (France) 1958

9 - BARON C., LE BOULCH N., RAOUL Y., Bull. Soc. Chim. (France) 1955, 948

10 - BAXTER J.G., ROBESON C.D., Science, 1940, 92, 203

11 - BROCKMANN H.j SHODDER H., Ber. 1941, 74, 73

12 - CLOUGH, F.B., KASCHER H.M., ROBESON C.D., J. BAXTER J.G., Science 1947, 105, 436

13 - CORMIER M., Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1255

14 - CORMIER C.R.A.C. Sci.1959, 248, 318

15 - COWARD K.H., DYER F.J., MORTON R.A., Biochem. J., 1932,26, 1593

16 - DAVIES A.W., MOORE T., Nature 1941, 147, 794

17 - DE N.K., Indian J. Med. Res. 1935, 23, 505

18 - EDISBURY J.R., GILLAM A.E., HEILBRON I.M., MORTON R.A., Biochem. J., 1932, 26, 1164

19 - EMBREE N.D., Biochem. J. 1938, 128, 187

20 - EMBREE N.D., Industr. Eng. Chem. Anal. Ed. 1941, 13, 144

21 - EMBREE N.D., SHANTZ E.M., J. Amer. Chem. Soc. 1943, 65, 906

22 - EMBREE N.D., SHANTZ E.M., J. Amer. Chem. Soc. 1943, 65, 910

23 - EULER (Von) H., KARRER P., ZUBRYS A., Helv. Chim. Acta, 1934, 17, 24

24 - EULER (Von) H., KARRER (P.) Helv. Chim. Acta 1949, 32, 461

25 - Expert Committee ou Biological Standardisation - Report of the Subcommittee on Fat-Soluble Vitamins - W.H.O. Tech. Rep. Series n° 3 (1950)

26 - GLOVER J., GOODWIN T.W., MORTON R.A., Biochem. J., 1948, 43, 109

27 - GOULD Jr R.J., J. Biol. Chem. 1936, 114, xPi

28 - HAMANO S., Sci, Pap. Inst. Phys. Chem. Res., Tokyo, 1935, 26, 61, 82, 87

29 - HEILBRON I.M., HESLOP R.N., MORTON R.A., WEBSTER E.T., REA J.L., DRUMMOND J.C., Biochem. J., 1932, 26, 1178

30 - HEILBRON I.M., MORTON R.A., WABSTER E.T. Biochem. J., 1932, 26, 1194

31 - HICKMAN K.C.D., Ann. Rev. Biochem. 1943, 12, 353

32 - HIGUGHI T., REINSTEIN J.A., J. of the Arm. Pharm. Association Sc., 1959, 48, 155

33 - HOLMES H.N., CORBET R.E., J. amer. Chem. Soc. 1937, 59, 2042

34 - ISLER O., HUBER W., RONCO A., KOFLER M., Helv. Chim. Acta, 1947, 30, 1911

35 - ISLER O., KOFLER M.,HUBER W., RONCO A., Experientia 1946, 2, 31

36 - ISLER O., RONCO A., GUEY W., HINDLEY N.C., HUBER W., DIALER K., KOFLER M. Helv. Chim. Acta, 1949, 32, 489

37 - JUTZ O., Thèse Pharmacie, Paris 1960

38 - KARRER P., BENZ J. Helv. Chim. Acta 1948, 31, 1048

39 - KARRER P., MORF R., Helv. Chim. Acta, 1933, 16, 557

40 - KARRER P. MORF R. et SCHOPP K., Helv. Chim. Acta, 1931, 14, 1036

41 - KARRER P., MORF R., Helv. Chim. Acta, 1933, 16, 625

42 - KUHN R., MORRIS C.V.O.R., Ber. 1937, 70, 853

43 - League of Nations Health Organisation (1934) 2 nd Conférence on Vitamin Standardisation. Quart. Bull. Hlth. Org. L O N 1934, 3, 428

44 - LEDERER E., Chromatographie III, p. 644, Masson Paris 1960

45 - LITTLE R.W., Indust. Eng. Chem. Anal. Ed. 1944, 16, 288

46 - MEDICAL RESEARCH Council (1935) Spécial Report Séries n° 202, London Stationery Office

47 - MEUNIER P., Chromatographie et Mésomérie, p. 74, Masson, Paris 1947

48 - MEUNIER P., DULOU R., VINET A., Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 371

49 - MEUNIER P., JOUANNETEAU J.J., ZWINGELSTEIN G., C.R.Ac.Sci. 1950, 231, 1170

50 - MEUNIER P., JOUANNETEAU J.J., ZWINGELSTEIN G., C.R.Ac.Sci 1951, 232, 2490

51 - MEUNIER P., VINET A., C.R.Acad.Sci 1944, 219, 141

52 - MILAS N.A., SAKAL E., PLATI J.T., RIVERS J.I., GROSSI J.K., WEISS Z., CAMPBELL M.A., WRIGHT H.F., J.Am. Chem. Soc. 1948, 70, 1957

53 - MOORE T., Vitamin A. ELSEVIER, Publishing Company 1957

54 - MORTON R.A., Nature, 1944, 153, 69

55 - MORTON R.A., J. Pharm. Pharmacol. 1950, 2, 129

56 - MORTON R.A., GOODWIN T.W., Nature 1944, 153, 405

57 - MORTON R.A., HEILBRON I.M., Nature 1928, 122, 10

58 - MORTON R.A., STUBBS A.L., Analyst. 1946, 71, 348

59 - MORTON R.A., STUBBS A.L., Biochem. J., 1947, 41, 525

60 - MULLER P.B., Helv. Chim. Acta 1943, 26, 1944

61 - MULLER P.B., Helv. Chim. Acta 1944, 27, 443

62 - Official and Tentativ. Méthods of Analysis 6ème Ed. 1945 p. 625

63 - OROSHNIK W., Science 1954, 119, 660

64 - PANCRAZIO G., VITTALI M., Farmaco Ed. path. 1959, 14, 480

65 - PAULING L. Iortschr. Chem. Organ. Naturstoffe 1939, 3, 203

66 - PRELOT M., Thèse Pharmacie, Paris 1958

67 - RANDOIN L., LECOQ M. Bull. Soc. Chim. Biol. 1928, 10, 506

68 - RAOUL Y., Rev. Int. de Vitaminologie, 1958, 28, 306

69 - RAOUL Y., LE BOULCH N., GUERILLOT-VINET A., Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 495

70 - RAOUL Y., LE BOULCH N., BARON C., BAZIER R., GUERILLOT-VINET A., Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 495

71 - RAOUL Y., MARNAY C., LE BOULCH N. GUERILLOT-VINET A., GOUNELLE H., Ann. Pharm. Franç. 1959, 17, 481.

72 - ROBESON C.D., J. BAXTER J.G., J. Amer. Chem. Soc. 1942, 64, 2407

73 - ROBESON C.D., BAXTER J.G., Nature 1945, 155, 300

74 - RUZICKA L., FISCHER W., Helv. Chim. Acta. 1934, 17, 633

75 - SERVIGNE M., GUERIN de MONTGAREUIL P., PINTA M., Ann. Nut. Alim. 1950, 4, 421

76 - SHANTZ E.M., J. Biol. Chem. 1950, 182, 515

77 - SHANTZ E.M., CAWLEY J.D., EMBREE N.D., J. Amer. Chem. Soc. 1943, 65, 901

78 - SHARMAN I.M., British J. Nutrition 1943, 3, Viii

79 - SMITH E.L., Biochem. J.,1939, 33, 201

80 - SMITH E.L., STERN B.E., YOUNG F.E., Nature, 1938, 141, 551

81 - THOMPSON S.Y., GANGULY J., KON S.K., British J. of Nutrition, 1949, 3, 50

82 - VACHER M., LORTIE Y., C.R. Ac. Sci. 1943, 216, 782

83 - VAN DORP D.A., ARENS J.F., Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1946, 65, 338

84 - VAN DORP D.A., J. ARENS J.F., Nature 1947, 160, 189

85 - ZECHMEISTER L., Chem. Rewiews 1944, 34, 267

TABLE DES MATIERES

Pages

Introduction 1

- Rappel des propriétés physico-chimiques de la Vitamine A_1

- Dérivés naturels ou artificiels de la Vitamine A_1 3

Plan du travail 12

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE LA FORMATION DE L'ANHYDRORETINOL A PARTIR DU RETINOL ET DE L'ACETATE DE RETINOL "IN VITRO"

Chapitre I - Etude physico-chimique de l'Anhydrovitamine A_1 15

- Structure de l'anhydrovitamine A_1 15

- Propriétés de l'anhydrovitamine A_1 16

Chapitre 2 - Préparation et caractérisation de l'anhydrovitamine A : Techniques 20

- Réactifs utilisés 20

- Préparation de l'anhydrovitamine A_1 24

1°/- Préparation de l'anhydrovitamine A par action de l'éthanol chlorhydrique et caractérisation immédiate par examen spectrophotométrique 24

2°/- Méthode personnelle : préparation de l'anhydrovitamine A par action du sulfate de zinc en milieu non polaire 25

-Séparation et dosage de l'anhydrorétinol 26

-Conclusion 32

Pages

Chapitre 3 - Etude de la formation de l'anhydrorétinol à partir du rétinol ou de l'acétate de rétinol "in vitro par action de l'éthanol chlorhydrique..... 33

- Déshydratation du rétinol en milieu polaire par action de l'éthanol chlorhydrique 33

- Transformation de l'acétate de rétinol en anhydrorétinol en milieu polaire par action de l'éthanol chlorhydrique 39

- Discussion 45

Chapitre 4 - Etude de la formation de l'anhydrorétinol à partir du rétinol ou de l'acétate de rétinol "in vitro" par action du sulfate de zinc 49

- Déshydratation d'une solution renfermant 100 /ml. de rétinol par le sulfate de zinc desséché 49

- Transformation d'une solution renfermant 100 /ml. de rétinol par le sulfate de zinc desséché 51

- Déshydratation du rétinol par le sulfate de zinc à différents degrés d'hydratation..... 54

a/- Action du sulfate de zinc 7 OH^2 pulvérisé 54

b/- Action comparative de trois sulfates de zinc à différents degrés de cristallisation 57

c/- Déshydratation par le sulfate de zinc: Etude quantitative 61

- Discussion 64

- Conclusion 66

Conclusion de la 1ère partie 67

Pages

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL EN PRESENCE DE LIPIDES EXTRAITS DE FOIES

Chapitre 1 - Dosage et séparation de la Vitamine A dans les milieux naturels 69

- Etude de la méthode spectrophotométrique 70

- Méthode personnelle : dosage spectrophotométrique de la Vitamine A 72

Chapitre 2 - Préparation des huiles de foies - Dosage et recherche de l'anhydrovitamine A dans les huiles de foies. Déshydratation dans les conditions utilisées "in vitro" de la vitamine A contenue dans les huiles de foies 74

- Préparation des huiles de foies 74

- Dosage de la vitamine A dans les huiles de foies 75

- Recherche de l'anhydrorétinol dans les lipides extraits des foies 76

- Déshydratation de la Vitamine A contenue dans les lipides extraits des foies 79

Chapitre 3 - Etude de la déshydratation du rétinol synthétique en présence de lipides de foies 84

I - Déshydratation du rétinol en présence de différents lipides

- Huiles extraites de foies frais 84

- Déshydratation par SO^4 Zn 84

- Déshydratation par éthanol chlorhydrique 0,0005 N 92

- Discussion 93

- Huiles conservées 95

- Huiles végétales - Glycéride synthétique 98

- Conclusion 99

II - Etude de la stabilité du rétinol en présence de sulfate de zinc et de lipides

- Conclusions de la 2ème partie 103

TROISIEME PARTIE

APPROCHE ANALYTIQUE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL PRESENTE DANS LES LIPIDES DE FOIES

I - Fractionnement des extraits lipidiques par saponification 105

II - Fractionnement des extraits lipidiques par chromatographie 109

III- Extraction après saponification et diffusion lente en milieu calcique 115

Conclusions de la 3ème partie 123

QUATRIEME PARTIE

APPROCHE SYNTHETIQUE DE LA NATURE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE DE LA DESHYDRATATION DU RETINOL PRESENTE DANS LES LIPIDES DES FOIES

- GENERALITES SUR L'OBTENTION DES STEROIDES RESULTANT DE L'ACTION DE LA FLORIDINE ACTIVEE SUR LA VITAMINE D_3 124

Chapitre 1 - Etude de l'action antidéshydratante des stéroïdes dérivés de la vitamine D_3 130

I - Action protectrice sur la déshydratation du rétinol de stéroïdes de structure connue... 131

II - Action protectrice sur la déshydratation du rétinol de fraction stéroïdique de structure encore inconnue 136

Discussion 141

Etude de l'action antidéshydratante de lipides provenant de foies d'animaux, poussins ou rats ayant reçu soit de la D_3, soit du corps "250 - 290", soit carencés en vitamine D_3 145

Conclusion de la 4ème partie 150

DISCUSSION GENERALE 151

CONCLUSIONS GENERALES 153

BIBLIOGRAPHIE 156

TABLE DES MATIERES 160